

**UNTERSUCHUNG ZUR ENZYMATISCHEN BINDUNG
DES SIGNALPOLYPEPTIDS UBIQUITIN
AN DEN ENZYMAKTIVATOR CALMODULIN**

RAINER ZIEGENHAGEN

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554801_0052

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. H. P. Jennissen

UNTERSUCHUNG ZUR ENZYMATISCHEN BINDUNG
DES SIGNALPOLYPEPTIDS UBIQUITIN
AN DEN ENZYMAKTIVATOR CALMODULIN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Rainer Ziegenhagen
aus
Osterburken

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. H. P. Jennissen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. K. Tempel

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1.	ATP-abhängige Proteasen	2
2.2.	ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease	3
2.2.1.	Ubiquitin-konjugierende-Aktivität	4
2.2.2.	Konjugat-abhängige Protease	6
2.3.	Ubiquitin	7
2.4.	Calmodulin	8
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	10
3.1.	Präparative Methoden	10
3.1.1.	Isolierung von Ubiquitin aus Erythrozyten	10
3.1.2.	Isolierung von Ubiquitin aus Schweine- herzen	13
3.1.3.	Isolierung der Phosphorylase Kinase	14
3.1.4.	Isolierung des Calmodulins	15
3.1.4.1.	Herstellung der Fluphenazin-Sepharose	15
3.1.4.2.	Isolierung aus Rinderhoden nach Autric et al. (1980) und Rochette-Egly et al. (1982)	15
3.1.4.3.	Isolierung der Delta-Untereinheit (Calmo- dulin) der Phosphorylase Kinase	15
3.1.4.4.	Denaturierung des Calmodulins mit Sulfolan und anschließende Renaturierung (Sulfolanbehandlung)	15
3.1.5.	Anreicherung der Ubiquitin-konjugieren- den-Aktivität aus Reticulozyten	16
3.1.5.1.	Provokation einer Reticulozytose	16
3.1.5.2.	Lysatpräparation aus Reticulozyten	17

3.1.5.3.	Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozytenlysat	18
3.1.5.4.	Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus APF II durch Affinitätschromatographie mit Ubiquitin-Sepharose 4B	18
3.1.6.	Radioaktive Markierung des Ubiquitins mit ^{125}Jod	20
3.1.7.	Radioaktive Markierung von BSA mit ^{125}Jod	21
3.1.8.	Oxidierung der RNase	22
3.1.9.	Blotten von Elektrophoresegelen	23
3.1.10.	Präparation geblotteter Proteine von der Nitrocellulose-Membran für die Aminosäurenanalyse	24
3.1.11.	Affinitätschromatographische Reinigung des Calmodulin-Konjugates	26
3.2.	Analytische Methoden	27
3.2.1.	Bestimmung der Enzymaktivität der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease	27
3.2.1.1.	Durchführung	27
3.2.1.2.	Definition der Enzymaktivität	28
3.2.2.	Nachweis der Ubiquitinierungsaktivität	29
3.2.3.	Nachweis der Ubiquitinierung ausgewählter Substratproteine	31
3.2.4.	Bestimmung der Enzymaktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität	31
3.2.4.1.	Autoradiographische Methode	31
3.2.4.2.	Affinitätsadsorption (FP-Test)	32
3.2.4.3.	Definition der Enzymaktivität	35
3.2.5.	Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase	37
3.2.6.	Bestimmung der biologischen Aktivität des Calmodulins	37

3.2.7.	Proteinbestimmung im automatisierten Test nach Lowry et al. (1951)	38
3.2.8.	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)	39
3.2.8.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)	39
3.2.8.2.	Calcium-abhängige SDS-Polyacrylamidgel-elektrophoresen nach Williams et al. (1984)	40
3.2.8.3.	Coomassie-Färbung	41
3.2.8.4.	Dokumentation der SDS-Gele	41
3.2.9.	Anfertigen von Autoradiogrammen	42
3.2.10.	Bestimmung der molekularen Massen	42
3.2.11.	Aminosäurenanalyse	43
3.2.12.	Messung der Gammastrahlung von ^{125}Jod -markierten Proteinen	47
3.2.13.	Anfärbung der Reticulozyten	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Ubiquitin	48
4.1.1.	Ubiquitin aus Schweineerythrozyten	48
4.1.1.1.	Isolierung von Ubiquitin aus Erythrozyten	48
4.1.1.2.	Verhalten von markiertem und unmarkiertem Ubiquitin hinsichtlich der Säulenchromatographieverfahren	50
4.1.1.2.1.	Verhalten von ^{125}Jod -Ubiquitin und unmarkiertem Ubiquitin auf CM-Sephadex	50
4.1.1.2.2.	Verhalten von ^{125}Jod -Ubiquitin und unmarkiertem Ubiquitin auf Sephadex G 50	50
4.1.1.3.	Reinheitskriterien	53
4.1.1.3.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)	53
4.1.1.3.2.	Aminosäurenanalyse	53
4.1.1.4.	Biologische Aktivität des Ubiquitins aus Erythrozyten	55

4.1.1.5.	Poolbestimmung im Erythrozyten	55
4.1.2.	Ubiquitin aus Schweineherzen	57
4.1.2.1.	Isolierung von Ubiquitin aus Schweineherzen	57
4.1.2.2.	Biologische Aktivität des Ubiquitins aus Schweineherzen	58
4.1.2.3.	Poolbestimmung im Schweineherzen	58
4.2.	Ubiquitinierung bekannter Substratproteine	62
4.2.1.	Ubiquitinierung von oxidiertter RNase	62
4.2.2.	Ubiquitinierung von Lysozym	65
4.3.	Ubiquitinierung von Calmodulin (CaM)	67
4.3.1.	Charakterisierung des eingesetzten Calmodulins	67
4.3.2.	Nachweis der Calmodulin-Konjugate	70
4.3.3.	Charakterisierung der Calmodulin- Ubiquitin-Konjugate	71
4.3.3.1.	Bestimmung der molekularen Massen	71
4.3.3.2.	Vergleich der Ubiquitinierungsrate von Calmodulin-Konjugaten 1-3. Ordnung	77
4.3.3.3.	Ca ²⁺ -abhängige Funktionsunterschiede	79
4.3.3.3.1.	Verhalten des Ubiquitin-Calmodulin- Konjugates (uCaM) auf Fluphenazin- Sephadex (FP-Sephadex)	79
4.3.3.3.2.	Ca ²⁺ -abhängige Mobilitätsänderung	82
4.3.3.4.	Aminosäurenanalyse des Calmodulin- Ubiquitin-Konjugates 1. Ordnung	86
4.3.3.4.1.	Reinigung des Konjugates	86
4.3.3.4.2.	Aminosäurenanalyse eines Kontrollproteins	92
4.3.3.4.3.	Aminosäurenanalyse des Calmodulin- Konjugates	92
4.3.4.	Meßverfahren (FP-Test) zur Ubiquiti- nierung von Calmodulin (CaM)	98
4.3.5.	Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins von der Ca ²⁺ -Konzentration	104
4.3.6.	Einfluß des Bindungszustandes des Calmodulins auf die Ubiquitinierung	108

4.3.7.	Einfluß der Sulfolandenaturierung und anschließende Renaturierung des Calmodulins (Sulfolanbehandlung) auf dessen Ubiquitinierbarkeit	110
4.3.8.	Kinetik der Ubiquitinierung von Calmodulin	112
4.3.9.	Einfluß der Ubiquitinkonzentration auf die Ubiquitinierung von Calmodulin	114
4.3.10.	Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins von der Enzymkonzentration	114
4.3.11.	Einfluß der Calmodulinkonzentration auf die Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität	117
4.3.12.	Einfluß von Hämin auf die Ubiquitin-Konjugierende-Aktivität	117
4.4.	Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozytenlysat	120
4.4.1.	Anreicherung über DEAE-Sephacel	120
4.4.2.	Weiterreinigung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (UCA) durch Affinitätschromatographie	122
5.	DISKUSSION	125
5.1.	Ubiquitin	125
5.2.	Ubiquitinierung bekannter Substratproteine	128
5.3.	Ubiquitinierung des Calmodulins	130
5.4.	Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität	141
5.5.	Mögliche Bedeutung der Ubiquitinierung des Säuger-Calmodulins	142
6.	ZUSAMMENFASSUNG	145
	SUMMARY	147
7.	LITERATURVERZEICHNIS	149



ABKÜRZUNGEN

Akt.	Enzymaktivität
AMP	Adenosinmonophosphat
APF II	ATP-dependent proteolytic factor II
ASX	Asparagin und Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Bq.	Becquerel
CaM	Calmodulin
Chloramin-T	N-Chlor-4 Toluolsulfonamid Na.salz trihydrat
CM	Carboxymethyl
cpm	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
DEAE	Diethylaminoethyl
DTE	1, 4, -Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (2-Aminoethyläther)-N, N'-tetraessigsäure
FP-Sepharose	Fluphenazin-Sepharose
GLX	Glutamin und Glutaminsäure
G-P-Dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
J	Jod
K _a	Assoziations-Konstante
kDa	=1000 Dalton
k _m	Michaelis-Konstante
Konz.	Konzentration
M _a	Masse des eingesetzten Tracers
ME	2-Mercaptoethanol
OD	Optische Dichte
ox.	oxidiert
P-Unit	Proteolyse Unit
RA _B	Radioaktivität der Konjugatbande
RA _E	Radioaktivität des säurelöslichen Anteils bei Inkubation mit Enzym
RA _K	Radioaktivität des EGTA-Eluates eines Kontrollansatzes
RA _N	Radioaktivität des säurelöslichen Anteils bei Inkubation ohne Enzym
RA _P	Radioaktivität des EGTA-Eluates einer Probe
RA _T	TCA-fällbare Radioaktivität des zugesetzten Substrates
Rev.	Übersichtsartikel
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SBS	Natriumlaurylsulfat
spez. Akt.	spezifische Enzymaktivität

spez RA _A	spezifische Radioaktivität des Tracers
spez RA _E	spezifische Radioaktivität des Endproduktes
spez RA _U	spezifische Radioaktivität des ¹²⁵ J-Ubiquitins
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TM-Lysin	Trimethyllysin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U-Unit	Ubiquitinierungs-Unit
Ubi.	Ubiquitin
UCA	Ubiquitin-konjugierende-Aktivität
uCaM	Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat
uLys	Ubiquitin-Lysozym-Konjugat
Upm	Umdrehungen pro Minute
uRNase	Ubiquitin-Ribonuklease-Konjugat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung des Ubiquitins als Cofaktor der ATP-abhängigen Proteolyse wurden große Fortschritte in der Erkenntnis der Bedeutung dieses Polypeptids erzielt.

Neben der Beteiligung des Ubiquitins bei der intrazellulären Proteolyse stehen heute eine mögliche Beteiligung des Polypeptids in der Regulation des Zellzyklusses (Ubiquitinierung des Semihistons H2A), sowie die Bedeutung der Ubiquitinierung von Zellrezeptoren, aber auch die klinischen Aspekte (z.B. Alzheimer Krankheit) im Mittelpunkt des Interesses.

Calmodulin nimmt als Aktivator einer Vielzahl von Enzymen eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellmetabolismus ein und ist heute Gegenstand vielfältiger Forschungstätigkeiten.

Berührungspunkte für die beiden, in ihrer Aufgabenstellung, sehr unterschiedlichen Proteine Calmodulin und Ubiquitin ergeben sich aus der Ubiquitinierbarkeit des Calmodulins (= kovalente Bindung des Ubiquitins an Calmodulin). Hierzu liegen für Säugercalmodulin, außer dem Nachweis der Ubiquitinierbarkeit, keipweiteren Ergebnisse vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die Ubiquitinierung des Säugercalmodulins zu untersuchen.

2. LITERATUR

2.1. ATP-abhängige Proteasen

ATP-abhängige Proteasen sind nur in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} aktiv. Diese Energieabhängigkeit besteht, obwohl die Proteolyse per se ein exergoner Prozess ist (Rev. Ciechanover et al., 1984).

Ein Wegbereiter der Entdeckung dieser ATP-abhängigen Proteasen war Simpson (1953), der erstmals die Energieabhängigkeit des intrazellulären Proteinabbaus beschrieb. Er konnte zeigen, daß in Rattenleberschnitten die Freisetzung von Aminosäuren aus radioaktiv markierten Proteinen durch Entkoppler der Atmungskette gehemmt wurde.

Ein wesentlicher Fortschritt auf diesem Gebiet wurde durch Hershko und Tomkins (1971) erreicht, die nachwiesen, daß in Hepatoma-Zellkulturen die verstärkte Proteolyse während des Hungerzustandes durch Proteinsynthesehemmstoffe stark eingeschränkt wurde, jedoch die basale Proteolyse erst durch Hemmstoffe, die die ATP-Synthese inhibierten.

Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die Wirkung des ATP-Entzugs lediglich auf einer Hemmung der Proteinsynthese beruht.

Um einen besseren Einblick in die Energieabhängigkeit der Proteindegradation zu erhalten, schlugen Kowit und Goldberg (1977) vor, die Proteolyse in zellfreien Extrakten zu untersuchen.

Dieser Vorschlag wurde durch die Ergebnisse von Botbol und Scornik (1979) unterstützt. Sie untersuchten die Proteolyse in Reticulozyten und zellfreien, löslichen Reticulozyten-extrakten. Durch Hemmung der Aminopeptidasen mit Bestatin, fanden sie beim Abbau von Globin in beiden Systemen ein sehr ähnliches Peptidmuster. Sie vermuteten daher, daß zellfreie, lösliche Systeme die intrazelluläre Proteolyse widerspiegeln (Botbol und Scornik, 1979).

Der Nachweis einer zellfreien, alkalischen, ATP-abhängigen Proteolyse gelang erstmals Etlinger und Goldberg (1977) in Reticulozytenlysat. Inzwischen wurden solche ATP-abhängigen Proteasen z.B. aus der mitochondrialen Matrix der Rinder-nebennierenrinde (Watabe und Kimura, 1985) und aus Erythro-leukämie-Zellen von Mäusen (Waxman et al., 1985) angerei-chert. 1985 berichteten Gehrke und Jennissen erstmals von einer ATP-abhängigen Protease in der Herz- und Skelett-muskulatur von Kaninchen, die inzwischen näher charakteri-siert wurde (Gehrke und Jennissen, 1987). DeMartino und Goldberg (1979) konnten in Rattenleberextrak-ten zwischen einer ATP-abhängigen Proteolyse (mit ATP-Spaltung) und einer ATP-stimulierbaren Proteolyse (ohne ATP-Spaltung) unterscheiden.

2.2. ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease

Die am intensivsten untersuchte ATP-abhängige Protease ist die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease aus Reticulo-zyten. 1977 berichteten Etlinger und Goldberg erstmals über den Nachweis einer alkalischen, ATP-abhängigen Protease in Reticulozyten.

Ciechanover et al. (1978) zeigten, daß dieses ATP-abhängige Degradationssystem in zwei Faktoren getrennt werden konnte:

- 1.) in einen hitzestabilen Faktor, "APF I" (ATP-Dependent Proteolytic Factor I), der später als Ubiquitin identifiziert wurde und
- 2.) in ein lösliches Enzymsystem, "APF II" (ATP-Dependent Proteolytic Factor II = ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease).

Ubiquitin wird durch dieses Enzymsystem ATP-abhängig kovalent an Proteine gebunden (Hershko, 1983). Diese, als "Ubiquitinierung" oder als "Konjugation" bezeichnete Reak-

tion, ist das Startsignal für die anschließende Degradation des Substratproteins, die mit der Freisetzung des gebundenen Ubiquitins einhergeht.

Somit läßt sich die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease in zwei weitere, funktionell unterschiedliche Enzymsysteme untergliedern (Hershko et al., 1980):

- 1.) in ein ubiquitinierendes System, hier nach Gehrke et al. (1987) "Ubiquitin-konjugierende-Aktivität" genannt
- 2.) in ein proteolytisch aktives System, als "Konjugat-abhängige Protease" bezeichnet (im Unterschied zur ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease, die beide Enzymsysteme umfaßt).

Interessant ist die Tatsache, daß die Fähigkeit zur ATP-abhängigen Proteolyse bei der Reifung zu Erythrozyten verloren geht (Speiser und Etlinger, 1982), während die Erythrozyten noch Ubiquitin enthalten.

Nicht unerwähnt sollen die Ergebnisse von Tanaka et al. (1983) bleiben, die eine Degradation von Proteinen mit methylierten oder alkylierten Aminogruppen in Reticulozyten feststellten. Da diese Proteine keine Substrate für die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease sind, wurde auf das zusätzliche Vorliegen einer ATP-abhängigen, aber Ubiquitin-unabhängigen Proteolyse in Reticulozyten geschlossen (Tanaka et al., 1983). Diese These wurde jedoch von Ciechanover et al. (1984) in Frage gestellt und konnte von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Hershko et al., 1984b und Gehrke und Jennissen, 1987).

2.2.1. Ubiquitin-konjugierende-Aktivität

Die klassische Form der Ubiquitinierung läuft in drei Schritten ab (Hershko, 1983):

- 1.) Ubiquitin wird durch das dimere Enzym E₁ ("Ubiquitin aktivierendes Enzym" nach Haas et al., 1982) an seinem C-terminalen Ende ATP-abhängig adenylyliert. Das ak-

tivierte Polypeptid wird anschließend unter Freisetzung von AMP über eine Thioesterbindung an E_1 gebunden, wobei jede Untereinheit eine Bindungsstelle besitzt (Haas und Rose, 1982).

- 2.) E_1 überträgt das gebundene Ubiquitin auf ein "Ubiquitin-Trägerprotein" (E_2), wobei das Ubiquitin ebenfalls über eine Thioesterbindung an dieses zweite Enzym gebunden ist. Bisher wurden fünf verschiedene Ubiquitin-Trägerproteine beschrieben (Pickart und Rose, 1985a). Vier von diesen können das Ubiquitin direkt an kleinere Proteine kovalent binden, z.B. Cytochrom C (Pickart und Rose, 1985a).
- 3.) Das fünfte Ubiquitin-Trägerprotein, und dies ist der "klassische Weg", überträgt das Ubiquitin auf ein weiteres Enzym, den "Substrat-Bindungsfaktor" (Hershko et al., 1986) E_3 , das die Bindung des Polypeptides an große Proteine wie BSA oder Kreatinkinase katalysiert.

Die Bindung zwischen Ubiquitin und den Substratproteinen ist eine Amidbindung (Hershko et al., 1980), unabhängig ob sie in zwei oder drei Schritten erfolgt. Hierbei reagiert das C-terminale Ende des Ubiquitins (Hershko et al., 1981) mit einer Epsilon- NH_2 -Gruppe eines Lysines oder dem N-terminalen Ende des Zielproteins. Die Proteine, an die Ubiquitin kovalent gebunden ist, werden konjugate genannt.

Ciechanover et al. (1985) sowie Ferber und Ciechanover (1986) konnten für einige Substratproteine eine t-RNA-abhängige Ubiquitinierung und Degradation im Reticulozytenlysat feststellen.

Abschließend bleibt zu erwähnen, daß Gehrke und Jennissen (1987) erstmals auch im Herzmuskel eine Ubiquitin-konjugierende-Aktivität nachweisen konnten, gleichwohl sie zeigten, daß die ATP-abhängige Proteolyse in diesem Gewebe Ubiquitin-unabhängig ist.

2.2.2. Konjugat-abhängige Proteolyse

Über die der Ubiquitinierung folgenden Reaktionen, die zur Degradation der konjugierten Proteine führen, ist wenig bekannt. Als einzig gesichert gilt die Regeneration des konjugierten Ubiquitins (Hershko et al., 1980).

So blieb bis heute die Frage der ATP-Abhängigkeit der Proteolyse ungeklärt. Ergebnisse von Hershko et al. (1984a) und Hough und Rechsteiner (1986) deuten zwar auf eine ATP-Abhängigkeit hin, jedoch stellten Ciechanover et al. (1980a) eine Freisetzung von Ubiquitin aus Konjugaten durch ATP-Entzug fest, was eine ATP-unabhängige Proteolyse impliziert.

Ebensowenig, wie die Frage der ATP-Abhängigkeit der Proteolyse geklärt ist, bleibt die Bedeutung von Mehrfachubiquitinierungen der Substratproteine (Hershko et al., 1980) im Dunkeln, wobei die von Hershko und Heller (1985) gefundene Möglichkeit der Bildung von Polyubiquitinketten in Ubiquitinkonjugaten noch weitere Fragen aufwirft.

Hough et al. (1986) konnten erstmals eine Protease anreichern, die Ubiquitinkonjugate abbaut. Diese hat eine geschätzte molekulare Masse von ca. 600 kDa und ein pH-Optimum von pH 8.

Als weiteres Enzym, das auf Ubiquitinkonjugate einwirken könnte, wurde von Pickart und Rose (1985b) eine "Ubiquitin-carboxyl-terminale Hydrolase" identifiziert. Dieses Enzym spaltete die Amidbindung zwischen Ubiquitin und Lysinen. Die physiologische Bedeutung dieses Enzyms ist bis heute ebenfalls ungeklärt.

2.3. Ubiquitin

Ubiquitin, der Cofaktor der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease aus Reticulozyten, ist ein kleines, hitzestabiles Protein mit einer molekularen Masse von 8,5 kDa (Hershko, 1983). Es wurde bisher aus einer Vielzahl von Organismen und Geweben isoliert (aus Hafer: Vierstra et al., 1985; aus Insekteneiern von *Ceratis capitata*: Gavilanes et al., 1982; ebenso aus Schafshoden: Loir et al., 1984; aus humanen Erythrozyten: Ciechanover et al., 1980b), wobei der Name dieses Polypeptides dem ubiquitären Vorkommen Rechnung trägt.

Das ubiquitäre Vorkommen ist mit einer Konservierung der Primärstruktur des Ubiquitins verbunden. So unterscheiden sich humanes und das Ubiquitin aus Hefen lediglich durch den Austausch von 3 Aminosäuren. Damit ist Ubiquitin, das in der Evolution am höchstkonservierteste Protein, das bisher bekannt ist (Özkaynak et al., 1984). Rechsteiner (1987) macht hierfür eine Multifunktionalität des Polypeptids verantwortlich, da es einen Einfluß auf die Chromatinstruktur und die Streßantwort von Zellen ausübt und schließlich eine Schlüsselfunktion bei der Proteolyse inne hat. Wobei für diese Multifunktionalität verschiedene Epitope des Ubiquitins von ausschlaggebender Bedeutung sein sollen.

1980 gelangen Wilkinson et al. erstmals der Nachweis, daß APF I und Ubiquitin identisch sind. Somit war seine Rolle als Cofaktor der Proteolyse geklärt. Nicht hingegen konnte die Bedeutung der Ubiquitinierung des Homingrezeptors von Lymphozyten (Siegelman et al., 1986) und der des Histones H2A (Goldknopf et al., 1977) geklärt werden, wobei im letzteren Fall eine Regulation des Zellzyklus für möglich gehalten wird.

Hershko et al. (1981) konnten erstmals nachweisen, daß die kovalente Bindung von Ubiquitin an Substratproteine durch das C-terminale Ende des Polypeptides vermittelt wird.

Die Bedeutung des C-Terminus konnten Wilkinson und Audhya (1981) unterstreichen, indem sie zeigten, daß eine Abspaltung der beiden C-terminalen Glycinreste des Ubiquitins mit dessen Inaktivierung verbunden ist.

Der Nachweis einer Ubiquitinierung von Zellproteinen in vivo wurde erstmals von Hershko et al. (1982) erbracht. Haas und Bright (1985) zeigten, daß ca. 83 % des intrazellulären Ubiquitins von Reticulozyten an Proteine gebunden sind.

Riley et al. (1988) wiesen mittels Immunofluoreszenz in der weißen und roten Skelettmuskulatur eine große Anzahl von ubiquitinierten Proteinen nach, die hauptsächlich in den Z-Linien lokalisiert sind.

Klinische Bedeutung hat das Ubiquitin bei der Alzheimer Krankheit erlangt, wo vermehrt ubiquitinierte Proteine auftreten (Perry et al., 1987). Ebenso ist Ubiquitin bei der erhöhten Proteolyse in Zellen nach einem Hitzeschock beteiligt (Parag et al., 1987).

2.4. Calmodulin

Calmodulin ist ein hitzestabiles, saures Protein mit einer molekularen Masse von 16,7 kDa. Seit seiner Entdeckung (Cheung, 1970; Kakiuchi und Yamazaki, 1970) wurde es in praktisch allen Geweben unterschiedlicher Organismen, wie Hefen (Hubbrad et al., 1982), Seeigel (Burgess, 1982) und Säugern (Cheung, 1970; Chafouleas et al., 1979) nachgewiesen. Der höchste Gehalt an Calmodulin wurde in dem elektrischen Organ des elektrischen Aals (*Electrophorus electricus*) mit 1g/kg Gewebe bestimmt (Childers und Siegel, 1975). Für die Skelettmuskulatur von Kaninchen gibt Kaiser (1988) einen Gehalt von 100–120 mg/kg an.

Der Name "Calmodulin" geht auf Cheung zurück (Rev. Klee und Vanaman, 1982) und ist eine Abkürzung für Calcium-Modulator-Protein und trägt den Haupteigenschaften dieses Proteins Rechnung, nämlich der Bindung von Ca^{2+} -Ionen und die

sich hieraus ergebende Fähigkeit des Calcium-haltigen Proteins an Enzyme zu binden und deren Aktivitäten zu modulieren. Diese Regulation von Enzymsystemen erfolgt in den unterschiedlichsten Geweben.

Calmodulin gilt als das wichtigste Akzeptorprotein für den "second messenger" Ca^{2+} (Cheung, 1985). Dieses Protein besitzt vier Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen, wovon zwei hochaffine Bindungsstellen einen K_m -Wert von $4,0 \cdot 10^{-6}$ M (Kohse und Heilmeyer, Jr., 1981) aufweisen. Mit einer Calcium-Bindung ist ein Konformationswechsel des Proteins verbunden (Dedman et al., 1977).

Einige der durch Calmodulin aktivierten Enzyme sind die Adenylatcyclase (Brostrom et al., 1975), die Glykogen Synthetase Kinase, die cAMP Phosphodiesterase, die Myosin Leichtketten Kinase und die Phosphorylase Kinase (Rev. Cheung, 1985). Die Phosphorylase Kinase weist als Besonderheit auf, daß ihre Delta-Untereinheit mit dem Calmodulin identisch ist (Cohen et al., 1978).

Nebst dieser herausragenden Stellung im Zellgeschehen machte der hohe Turnover des Calmodulins mit einer Halbwertszeit von ca. 0,4 Tagen (Petersen-von Gehr und Jennissen, 1982) dieses Protein als Substrat für die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität interessant.

Die Monoubiquitinierung von Säugercalmodulin wurde erstmals von Gehrke et al. (1987) beschrieben, obwohl eine solche bis dahin für unmöglich gehalten wurde (Gregori et al., 1985). Letztere Arbeitsgruppe stellte lediglich die Ubiquitinierung von Dictyostelium-Calmodulin fest, nicht aber von Säugercalmodulin. Hierbei wurde das Dictyostelium-Calmodulin lediglich am Lysin 115 ubiquitiniert. Dieses Lysin ist im Säugercalmodulin trimethyliert (Bazari und Clarke, 1981). Daraus schlossen Gregori et al. (1985), daß dem Trimethyllysin des Säugercalmodulins die Aufgabe zukommt, dieses vor einer Ubiquitinierung zu schützen.

3. METHODEN

3.1. Präparative Methoden

3.1.1. Isolierung von Ubiquitin aus Erythrozyten

Da Ubiquitin in hohen Konzentrationen in Erythrozyten vorhanden ist (Ciechanover et al., 1980b), wurde Schweineblut als Ausgangsmaterial verwendet. Dies hatte den Vorteil, daß seitens der Ubiquitinquelle keine Limitierung vorlag. Die Isolierung erfolgte modifiziert nach Gehrke und Jennissen (Gehrke, 1987) und Ciechanover et al. (1980b). Gewinnung gewaschener Erythrozyten: Frisches Schweineblut (10,2 l) wurde in silikonisierten (Silko-Spray, Fa. W. Rüsck) Kunststoffbehältern aufgefangen, zur Gerinnungshemmung mit Natriumcitrat (10 mM Endkonzentration) pH 7,4 versetzt und nach Wissler (1980) mit 0,51 l 2 % Methylcellulose (Fa. Fluka, Neu-Ulm) vermischt.

Die Methylcellulose befand sich in 150 mM NaCl, 10 mM Citrat, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4 (Puffer A). Die Suspension lagerte zur Sedimentation der Zellen 7 Stunden bei 4° C. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellfraktion mit 30 l Puffer A (+ 0,1 % Methylcellulose) verrührt. Nach 24 Stunden wurde der Überstand erneut abgesaugt und die Waschung noch zweimal wiederholt.

Kochschritt, TCA-Fällung und DE-52-Celluloseschritt: Die gewaschenen und gepackten Erythrozyten wurden durch eine 0,05 % (w/v) SDS-Lösung lysiert und bei 4° C für 30 Minuten gerührt ("Rohlysat"). Die festen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*1000, 8000 Upm (11000 g), 30 min, 4° C) abgetrennt ("Lysat"). Es folgte das Kochen des Überstandes bei 85° C für 20 Minuten. Die denaturierten Proteine wurden durch eine Filtration über Büchner-Trichter (Schwarzbandfilter, Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) beseitigt. Das Retentat wurde im gleichen Volumen 3 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0

(Puffer B) suspendiert und erneut filtriert. Die Durchflußfraktion wurde in einer Absaugflasche auf Eis gekühlt.

Anschließend erfolgte eine Proteinfällung mit TCA. Der Durchlauf wurde auf 5 % (w/v) Endkonzentration eingestellt. Nach einer einstündigen Sedimentation folgte eine Zentrifugation in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*1000, 8000 Upm (11000 g), 30 min, 4° C).

Das Pellet wurde in folgender Mischung aufgenommen:

5 ml 1 M Glycerophosphat pH 7,0

5 ml Aqua dest.

2 ml 2 M Tris

und anschließend ausführlich gegen 5 l Puffer B unter dreimaligem Pufferwechsel dialysiert (Dialysemembran: Spectrapor, Berghof GmbH, Tübingen).

Nach der Zentrifugation des Dialysates in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*250, 16000 Upm (12000 g), 30 min, 4° C) und pH-Wertkorrektur mit Essigsäure auf pH 7,0 wurde die Proteinlösung im Batchverfahren mit DE-52-Cellulose (Fa. Wathman, Maidstone; Großbritannien) vermischt, die in Puffer B äquilibriert war. Ubiquitin war bei dieser Negativsorption in der Durchflußfraktion. Das Verhältnis von Protein zu Gelvolumen betrug 2 g/l. Im Abstand von 5 Minuten wurde die Suspension 3 mal für 5 Minuten bei Raumtemperatur verrührt und anschließend über Büchner-Trichter (Blaubandfilter, Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) abgenutscht. Das Gel wurde nochmals mit dem 1,8-fachen seines Volumens in Puffer B verrührt und der zugesetzte Puffer ebenfalls abgenutscht.

Ionenaustauschchromatographie: Die Proteinlösung wurde mit 1 M HCl auf pH 6,0 eingestellt und auf eine mit 10 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 pH 6,0 (Puffer C) äquilibrierte CM-Sephadex Säule (Fa. Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Säulenhöhe betrug 17,7 cm, der Säulendurchmesser 11,2 cm, die Pumpgeschwindigkeit 170 ml/std und das Fraktionsvolumen 13,8 ml. Das Verhältnis von Protein zu Gelvolumen war 0,8 g/l.

Die Waschung erfolgte mit 3 Gelvolumina des Puffers C, die Elution mit 10 Gelvolumina eines linear ansteigenden Gradienten von 25 mM bis 125 mM KCl in Puffer C.

Da Ubiquitin kein Tryptophan und nur wenige aromatische Aminosäuren besitzt (Dieckman et al., 1980b), konnte nur ein niedriger, bei 280 nm absorbierender Proteingipfel beobachtet werden.

Die Ubiquitin enthaltenden Fraktionen wurden zunächst an Hand der TCA-fällbaren, und damit proteingebundenen Radioaktivität, identifiziert und anschließend SDS-gelelektrophoretisch auf die Reinheit des Ubiquitins untersucht. Die hierbei keine Kontamination mit Fremdproteinen zeigenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und mit Hilfe einer TCA-Fällung ankonzentriert (siehe oben), jedoch mit dem Unterschied, daß danach das Pellet in 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 aufgenommen und der pH-Wert der Lösung mit 2 M Tris auf pH 7-8 eingestellt wurde. Es folgte eine Dialyse gegen 5 l 20 mM Tris/HCl pH 7,5 bei dreimaligem Pufferwechsel und eine erneute Zentrifugation mit der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*250, 16000 Upm (12000 g), 30 min, 4° C).

Gelfiltration auf Sephadex G 50: Als weiterer und neuer Reinigungsschritt schloß sich eine Gelfiltration auf Sephadex G 50 Fine (Fa. Pharmacia, Freiburg) in 0,1 M Essigsäure an. Der Säulendurchmesser betrug 5,1 cm, die Höhe 31 cm, die Pumpgeschwindigkeit 100 ml/std, das Fraktionsvolumen 8,5 ml. Das Verhältnis von Proben- zu Gelvolumen war 1:21. In die Fraktionsröhrchen wurden 0,42 ml 2 M Tris vorgelegt, sodaß in dem daraus entstehenden Tris/Essigsäure Puffer ein pH-Wert von 7,5 entstand.

Die Fraktionen wurden zunächst wieder auf die TCA-fällbare Radioaktivität hin untersucht und der Radioaktivitätsgipfel SDS-gelelektrophoretisch analysiert.

Die Ubiquitin enthaltenden Fraktionen wurden zusammengefaßt und mit Hilfe einer TCA-Fällung ankonzentriert (siehe oben). Da bei der abschließenden Pelletaufnahme und Dialyse

ein Großteil des Ubiquitins unlöslich war, wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Das Pellet wurde wie üblich zunächst in 50 mM Tris/HCl pH 7,5 unter pH-Wertkorrektur mit 2 M Tris auf pH 7-8 aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Zugabe von Harnstoff bis eine gesättigte Lösung (ca. 5 M) entstand, dem folgte eine Dialyse zunächst gegen 50 mM Tris/HCl, dann gegen 20 mM Tris/HCl pH 7,5 mit je 5 l bei je zweimaligem Pufferwechsel. Abschließend erfolgte wie üblich eine Zentrifugation mit der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*250, 16000 Upm (12000 g), 30 min, 4° C). Der klare Überstand wurde in Aliquote abgefüllt und bei -80° C gelagert.

Zugabe des ^{125}J -Ubiquitins: Das radioaktiv markierte Ubiquitin wurde dem Rohlysate zugesetzt. Die zugesetzte Masse betrug 0,025 mg mit einer spezifischen Radioaktivität von $1,26 \cdot 10^8$ cpm/mg. Die Gesamtradioaktivität belief sich auf $3,2 \cdot 10^6$ cpm. Das ^{125}J -Ubiquitin wurde nach 3.1.6. hergestellt.

3.1.2. Isolierung von Ubiquitin aus Schweineherzen

Die Präparation des Ubiquitins aus Schweineherzen ist im wesentlichen mit der aus Erythrozyten identisch, weshalb hier nur auf die Unterschiede eingegangen wird, ansonsten wird auf Kapitel 3.1.1. verwiesen.

Isolierung der wasserlöslichen Proteinfraction: Die schlachtfrischen und auf Eis gelagerten Schweineherzen (3 Stück, 600g) wurden zunächst mit dem Messer grob zerkleinert, von den sehnigen Bestandteilen befreit und im Bühler-Homogenisator (Fa. Bühler, Bodelshausen) bei 4° C für 1 Minute homogenisiert (= "Homogenat" oder "Rohextrakt"). Als Homogenisierungspuffer diente 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM EDTA und 5 mg/l Leupeptin (Fa. Biomol, Ilvesheim) pH 8,0 (Puffer A). Das Volumen des Rohextraktes betrug 1,3 l.

Die wasserunlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*1000, 8000 Upm (11000 g), 30 min, 4° C) abgetrennt (= "Extrakt").

Kochschritt, TCA-Fällung und DE-52-Cellulose: Der Extrakt wurde für 20 Minuten auf 85° C erhitzt und die hitzestabilen Proteine anschließend über Büchner-Trichter (Blaubandfilter, Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) abgenutscht. Das Retentat wurde zur weiteren Auswaschung nochmals mit Puffer A aufgeschlämmt und bis zur Trockne abgenutscht.

Die anschließende TCA-Fällung, die notwendige pH-Wertkorrektur und das Batchverfahren wurden nach 3.1.1. ausgeführt.

Ionenaustauschchromatographie: Hier ergaben sich im Vergleich zu 3.1.1. lediglich folgende Änderungen: Die Säulenhöhe betrug 4,6 cm, das Fraktionsvolumen 8,6 ml und das Verhältnis von Protein zu Gelvolumen war 0,7 g/l.

Eine Gelfiltration auf Sephadex G 50 wurde nicht durchgeführt.

Zugabe des ^{125}J -Ubiquitins: Das radioaktiv markierte Ubiquitin wurde dem Rohextrakt zugesetzt. Die zugesetzte Masse betrug 0,55 mg mit einer spezifischen Radioaktivität von $8,1 \cdot 10^6$ cpm/mg. Die Gesamtradioaktivität belief sich auf $4,5 \cdot 10^6$ cpm. Das ^{125}J -Ubiquitin wurde nach 3.1.6. hergestellt.

3.1.3. Isolierung der Phosphorylase Kinase

Diese Isolierung wurde von G. Botzet und H.P. Jennissen ausgeführt. Sie erfolgte nach der Methode von Jennissen und Heilmeyer (1975), modifiziert nach Cohen (1973).

3.1.4. Isolierung des Calmodulins

3.1.4.1. Herstellung von Fluphenazin-Sepharose

Die Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose) wurde von J. Kaiser nach der Methode von Rochette-Egly et al. (1982) hergestellt. Mit ihr erfolgte die Calcium-abhängige Affinitätschromatographie des Calmodulins nach 3.1.4.2..

3.1.4.2. Isolierung aus Rinderhoden

Die Präparation wurde von G. Boztet und H.P. Jennissen nach der Methode von Autric et al. (1980) und Rochette-Egly et al. (1982) durchgeführt.

3.1.4.3. Isolierung der Delta-Untereinheit (Calmodulin) der Phosphorylase Kinase

10 mg der nach 3.1.3. präparierten Phosphorylase Kinase wurden nach Jennissen et al. (1985) für 3,5 min auf 85° C erhitzt und anschließend für weitere 5 min auf Eis gestellt. Danach folgte eine Zentrifugation für 2 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge (Fa. Eppendorf, Hamburg) bei 6000 g.

Der klare Überstand enthielt die SDS-gelelektrophoretisch reine Delta-Untereinheit (=Calmodulin, Grand et al., 1981).

3.1.4.4. Denaturierung des Calmodulins mit Sulfolan und anschließende Renaturierung (Sulfolanbehandlung)

Diese Modifikation wurde nach Kaiser und Jennissen durchgeführt (unveröffentlicht). Hierbei wird Calmodulin durch Sulfolan zunächst denaturiert und anschließend durch das

Herausdialysieren des Sulfolans wieder renaturiert. Calmodulin (8,23 mg/ml), nach 3.1.4.2. präpariert, wurde mit Sulfolan (zur Spektroskopie, Fa. Merck, Darmstadt; 75 % (v/v) Endkonzentration) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 24 Stunden gegen 5 l 10 mM Glycerophosphat, 0,1 mM CaCl_2 pH 7,0 bei Raumtemperatur dialysiert. Abschließend erfolgte eine Ankonzentrierung auf 8-10 mg/ml im Rotationslyophilisator (Speed Vak Concentrator, Fa. Bachhofer, Reutlingen).

3.1.5. Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozyten

Die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität ist bis auf die Affinitätschromatographie identisch mit der Anreicherung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease (Ciechanover et al., 1978).

3.1.5.1. Provokation einer Reticulozytose

Eine Reticulozytose wurde bei braunen Hauskaninchen (Alter 6 Monate) nach der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke, 1987), modifiziert nach Rabinowitz und Fisher (1964), hervorgerufen.

Es wurde 2,5 % Phenylhydrazin in 0,9 % NaCl pH 7,4 subcutan injiziert. Die Injektion erfolgte alternierend im Schulterbereich. Die Applikationsvolumina betrugen am 1. bis 4. Tag 0,22 ml/kg bzw. 0,13 ml/kg am 5. Tag. Die Blutentnahme aus der Ohrarterie (Arteria auricularis) fand am 8. Tag statt. Die Reticulozytenrate betrug zwischen 70 % und 80 %.

(zur Reticulozytenfärbung siehe 3.2.13.)

3.1.5.2. Lysatpräparation aus Reticulozyten

Die Herstellung erfolgte nach Gehrke und Jennissen (1987), modifiziert nach Ciechanover et al. (1978).

Das Kaninchenblut (siehe 3.1.5.1.) wurde in silikonisierten Gefäßen (Silko-Spray, Fa. W. Rüscher, Rommelshausen) aufgefangen. Zur Gerinnungshemmung wurde Natriumcitrat pH 7,4 in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Nach Zentrifugation in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*250, 4000 Upm (2500 g), 30 min, 4° C) wurde das Sediment zweimal mit dem 10-fachen des Blutvolumens in 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 und 150 mM NaCl pH 7,4 (Puffer A) resuspendiert und, wie angegeben, erneut zentrifugiert. Zwecks ATP-Verarmung inkubierten die gewaschenen und gepackten Reticulozyten für eine Stunde bei 37° C im Schüttelbad (Fa. Kottermann, Hänigsen) mit Puffer A, der zusätzlich noch 20 mM 2-Desoxy-D-Glucose und 0,2 mM 2,4 Dinitrophenol enthielt (Ciechanover et al., 1978). Das Verhältnis von Zell- zu Puffervolumen betrug 1:1.

Nach Zentrifugation wurden die Reticulozyten noch zweimal nach obiger Methode in Puffer A gewaschen.

Die hypotone Lyse der Reticulozyten erfolgte durch das Auffüllen des Zellvolumens auf das 2,5-fache mit 1,66 mM DTE-Lösung ("Rohlysat") im Eisbad für 3 Minuten. Die korpuskulären Bestandteile wurden anschließend durch Ultrazentrifugation in der Ultrazentrifuge UZ LB-70 (Fa. Beckman, München) bei 80000 g, 90 Minuten bei 4° C abgetrennt. Der Überstand ("Lysat") wurde bei -80° C in Aliquoten gelagert.

3.1.5.3. Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozytenlysat

Die Methode beruhte auf einem Verfahren von Gehrke und Jennissen (1987), modifiziert nach Ciechanover et al. (1978). Sie führte ebenfalls zur Anreicherung der ATP- und Ubiquitin abhängigen Protease. Es waren lediglich die Anreicherungsfaktoren und die Ausbeuten unterschiedlich (siehe Tab. 16). Deshalb wurde der Name, der ursprünglich nur auf die angereicherte Protease ("APF II") angewandt wurde, beibehalten.

Das Reticulozytenlysat wurde auf eine mit 3 mM K_2HPO_4 / KH_2PO_4 und 1 mM DTE pH 7,0 (Puffer A) äquilibrierte DEAE-Sephacel Säule (Fa. Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 76 ml/std, das Fraktionsvolumen 12,5 ml, der Säulendurchmesser 5 cm, die Höhe variierte je nach aufgetragener Proteinmenge, wobei stets 47 mg Protein pro ml gepacktes Gel aufgetragen wurden. Der Waschung mit Puffer A (6 Säulenvolumina) schloß sich die Elution mit 500 mM KCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,2 (Puffer B) an. Der gesamte bei 280 nm absorbierende Proteinpeak wurde Ammoniumsulfat-gefällt (65 g/100 ml, 10 Minuten, 0° C), wobei der pH-Wert der Lösung mit NH_4OH auf pH 7,5 eingestellt wurde. Es folgte eine Zentrifugation in der WKF-Zentrifuge (Rotor 6*250, 16000 Upm (12000 g), 30 min, 4° C). Das Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl, 1 mM DTE pH 7,6 (Puffer C) aufgenommen und gegen 5 l Puffer C dialysiert. Der Ubiquitin-freie Enzym-pool (Ciechanover et al., 1978) wurde bei -80° C eingefroren.

3.1.5.4. Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus APF II durch Affinitätschromatographie mit Ubiquitin-Sepharose 4B

Das Verfahren nach Gehrke et al. (1987) basierte auf einer

Modifikation der Methode nach Hershko et al. (1983). Grundlegender Gedanke hierbei ist, daß die Bestandteile der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (E_1 , E_2 , E_3) unterschiedlich, jedoch spezifisch an die Ubiquitin-Sepharose gebunden werden. Das Ubiquitin aktivierende Enzym (E_1) wird ATP-abhängig kovalent an die Affinitätssäule gebunden. In Gegenwart von ATP und E_1 wird E_2 ebenfalls gebunden. Beide Enzyme können durch Entfernen des ATP und gleichzeitiges Alkalisieren des Milieus spezifisch eluiert werden. Dagegen ist die Bindung von E_3 ATP-unabhängig und kann ebenfalls durch Verschieben des pH-Wertes ins Alkalische (pH 9) wieder aufgehoben werden. Deshalb ist bei dieser Anreicherung des Enzymsystems eine ATP-unabhängige und eine ATP-abhängige Affinitätschromatographie zu unterscheiden.

Herstellung der Ubiquitin-Sepharose:

Die Herstellung der Ubiquitin-Sepharose wurde von P. Gehrke nach der Methode von Gehrke et al. (1987) ausgeführt. Der Substitutionsgrad der Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Freiburg) betrug 20 mg Ubiquitin pro ml gepacktes Gel.

ATP-unabhängige Affinitätschromatographie nach Gehrke et al. (1987), modifiziert nach Hershko et al. (1983) und Hershko et al. (1986):

APF II (70 mg) wurde für 4 Stunden bei 4° C gegen 0,5 l 50 mM Tris/HCl, 0,2 mM DTE, 0,5 mg/l Leupeptin (Fa. Bio-mol, Ilvesheim) pH 7,2 (Puffer A) dialysiert und auf die mit 50 mM Tris/HCl pH 7,2 (Puffer B) äquilibrierte Säule aufgetragen. Der Säulendurchmesser betrug 0,65 cm, die Höhe 6,3 cm, die Durchflußgeschwindigkeit 0,5 ml/min, die Proteinmasse 70 mg. Der Auftrag erfolgte bei Raumtemperatur, während die Fraktionen auf Eis gesammelt wurden. Es folgte eine Waschung (5 Säulenvolumina) mit 50 mM Tris/HCl, 0,2 mM DTE, 0,1 mM EDTA pH 7,2 (Puffer C), der sich die Elution (3 Säulenvolumina) mit 50 mM Tris/HCl, 2 mM DTE pH 9 (Puffer D) anschloß. Das Eluat wurde mit Centricon UM 30 (Fa. Ami-

con, Witten) ankonzentriert und einmal mit Puffer A gewaschen. Das erneut ankonzentrierte Eluat wurde bei -80°C gelagert.

Die Regeneration der Säule erfolgte mit 10 Gelvolumina des Puffers B, der zusätzlich noch 1 M KCl enthielt und einer anschließenden Auswaschung des KCl mit Puffer B (10 Gelvolumina).

ATP-abhängige Affinitätschromatographie nach Gehrke et al. (1987), modifiziert nach Hershko et al. (1983) und Hershko et al. (1986):

Sie wurde nach der ATP-unabhängigen Affinitätschromatographie ausgeführt. Der Durchlauf von der ATP-unabhängigen Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe von Centricon UM 30 (Fa. Amicon, Witten) auf das ursprüngliche Auftragsvolumen ankonzentriert und auf folgende Endkonzentrationen eingestellt: 50 mM Tris/HCl, 2 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 0,2 mM DTE, 0,5 mg/l Leupeptin (Fa. Biomol, Ilvesheim) pH 7,2 (Puffer F) und erneut unter den gleichen Bedingungen wie zuvor (siehe oben) auf die regenerierte Säule aufgetragen. Es folgte eine Waschung der Säule (3 Säulenvolumina) mit Puffer F mit anschließender Elution (4 Säulenvolumina) mit 50 mM Tris/HCl, 10 mM DTE, 0,1 mM EDTA pH 9,0.

Ankonzentrierung des Eluates, Waschung in 50 mM Tris/HCl, 0,5 mM DTE pH 7,2 und erneute Ankonzentrierung erfolgten in Centricon UM 30 (Fa. Amicon, Witten). Das Eluat wurde ebenfalls bei -80°C gelagert.

3.1.6. Radioaktive Markierung des Ubiquitins mit ^{125}Jod

Die Radioaktivmarkierung wurde nach der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke, 1987), modifiziert nach Ciechanover et al. (1980a) ausgeführt.

Um die nötige Proteinkonzentration von 50 mg/ml zu erreichen, wurde das Ubiquitin mit Centricon YM 10 (Fa. Amicon, Witten) bei 4°C ankonzentriert.

Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 0,03 ml Ubiquitin (50 mg/ml), 0,005 ml 1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,5, 0,01 ml $Na^{125}J$ (37 MBq) (Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig) und 0,005 ml Chloramin-T (2 mg/ml) (Fa. Serva, Heidelberg). Die Reaktionszeit betrug 90 Sekunden bei Raumtemperatur. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 0,005 ml Natriummetabisulfit (2 mg/ml). Die spezifische Radioaktivität des nicht umgesetzten ^{125}J wurde durch Zugabe von 0,2 ml Kaliumjodidlösung (10 mg/ml) herabgesetzt. Chloramin-T, Natriummetabisulfit und Kaliumjodid wurden stets frisch angesetzt und waren in 150 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7,5 gelöst.

Die nicht proteingebundene Radioaktivität wurde durch Gel-filtration auf Sephadex G 50 Fine (Fa. Pharmacia, Freiburg) in 0,1 M Essigsäure abgetrennt. Der Säulendurchmesser betrug 0,8 cm, die Höhe 21 cm, die Pumpgeschwindigkeit 18 ml/std und das Fraktionsvolumen 0,9 ml. Zur Detektion der proteingebundenen Radioaktivität wurden Aliquote, der mit 2 M Tris gepufferten Fraktionen, TCA gefällt (5 % w/v Endkonzentration, 30 Minuten bei 0° C) und nach Zentrifugation (2 min, 10000 g) im Gamma-Zähler gemessen.

Die Peakfraktionen wurden zusammengefaßt und zur weiteren Abtrennung der freien Radioaktivität TCA gefällt (siehe oben). Das Pellet wurde anschließend in 0,05 ml 1 M Tris/HCl pH 8 aufgelöst und mit aqua bidest auf 0,5 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -30° C.

Der Anteil der freien Radioaktivität betrug ca. 1,5 %. Die Proteinausbeute lag bei maximal 25 %, die höchste spezifische Radioaktivität bei $1,12 \cdot 10^9$ cpm/mg.

3.1.7. Radioaktive Markierung von BSA mit ^{125}J

Die Markierung des Rinderserumalbumins (BSA) erfolgte nach der Methode von Gehrke und Jennissen (Gehrke, 1987), modifiziert nach Van Eldik und Watterson (1981).

Die Reaktionslösung setzte sich wie folgt zusammen:

0,01 ml BSA (2 mg/ml), 0,01 ml Chloramin-T (0,8 mg/ml) und 0,005 ml Na^{125}J (18,5 MBq) (Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig).

Die Reaktion (20 Sekunden, Raumtemperatur) wurde durch Zugabe von 0,01 ml Natriummetabisulfit (10 mg/ml) gestoppt. Die Zugabe von 0,05 ml BSA (50 mg/ml) sollte eine mögliche Autoradiolyse verhindern, die Zugabe von 0,1 ml Kaliumjodid sollte die spezifische Radioaktivität des freien ^{125}J herabsetzen.

Die Abtrennung des freien Jods erfolgte mittels Gelfiltration auf Sephadex G 10 (Fa. Pharmacia, Freiburg) in 10 mM Tris/HCl pH 7,6 (Säulendurchmesser 1 cm, -höhe 15 cm, Pumpgeschwindigkeit 15 ml/std).

Zur Feststellung der proteingebundenen Radioaktivität wurde ebenfalls eine TCA-Fällung nach 3.1.6. vorgenommen. Die Spitzenfraktionen wurden zusammengefaßt und bei -30°C gelagert.

Reduktion und S-Alkylierung von ^{125}J -BSA: Die Reduktion mit DTE und S-Alkylierung mit Jodacetamid wurde nach Wilkinson und Audhya (1981) durchgeführt.

Diese Modifikation des ^{125}J -BSA war nötig, um bei der Messung der ATP-abhängigen Proteolyse reproduzierbare Daten zu erhalten (Wilkinson und Audhya, 1981).

Der Anteil der nicht proteingebundenen Radioaktivität betrug nach der Modifikation 4 %.

3.1.8. Oxidierung der RNase

Die Oxidierung von RNase aus Rinderpankreas, Typ 1 A (Fa. Sigma, München) mit Perameisensäure wurde nach der von Hiers (1955) beschriebenen Methode ausgeführt. Diese Denaturierung war nötig, um ein gutes Substrat für die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität zu erhalten (Hershko et al., 1983).

Perameisensäure wurde durch Zugabe von 0,5 ml 30 % H_2O_2 (Fa. Merck, Darmstadt) zu 9,5 ml Ameisensäure (99 %; Fa. Merck, Darmstadt) hergestellt. Die Lösung ruhte für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur und wurde anschließend auf $-5^\circ C$ gekühlt.

200 mg RNase aus Rinderpankreas, Typ 1 A (Fa. Sigma, München) wurden in 5 ml 99 % Ameisensäure, 1 % Methanol (beide Fa. Merck, Darmstadt) gelöst und ebenfalls auf $-5^\circ C$ gekühlt. Danach wurden beide Lösungen unter Rühren gemischt und die Reaktionslösung für 2,5 Stunden auf $-5^\circ C$ gekühlt. Zum Reaktionsstop wurde die Lösung mit vorgekühlten 385 ml aqua bidest verdünnt, sofort eingefroren und anschließend lyophilisiert. Das lyophilisierte Protein wurde zur vollständigen Abtrennung der Säure nochmals in 40 ml aqua bidest aufgenommen und zum zweiten Mal lyophilisiert.

3.1.9. Blotten von Elektrophoresegelelen

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) wurde nach 3.2.8.1. ausgeführt.

Das Blotten der Elektrophoresegelele erfolgte im Semi-Dry Verfahren (SatoroBlott, Fa. Satorius, Göttingen) mit 50 mM Boratpuffer pH 9,0, der 20 % (v/v) Methanol enthielt. Als Blottmembran diente eine Nitrocellulosemembran (0,2 μm Porendurchmesser, Fa. Schleicher und Schüll, Dassel).

Der Blottaufbau sah wie folgt aus:

Kathodenplatte

3 Lagen Wathman-Filterpapier Nr. 3 (Fa. Wathman, Maidstone; Großbritannien)

1 Lage Nitrocellulose-Membran

Polyacrylamidgel

2 Lagen Nitrocellulose-Membran

3 Lagen Wathman-Filterpapier Nr. 3

Anodenplatte

Die Graphitplatten der Blottkammer wurden zuvor 5 Minuten mit aqua bidest gewässert. Die Nitrocellulose und das Filterpapier lagen für 5 Minuten im Blottpuffer und wurden nach Abtropfen der Flüssigkeit eingesetzt. Luftblasen wurden durch Ausrollen mit einer Glaspipette nach jeder Lage entfernt.

Das geblottete Gel hatte eine Fläche von 112 cm².

Im Gegensatz zu sonst üblichen Blottverfahren wurde die Spannung (4,5 V) und nicht die Stromstärke konstant gehalten, da sich zeigte, daß bei höheren Spannungen die Ausbeuten an geblottetem Konjugat abnahmen. Die Stromstärke betrug zu Beginn des Blottens 0,5 mA/cm² und nahm dann mit zunehmender Dauer ab. Die Elektrophoresegelte wurden für 2 Stunden geblottet.

3.1.10. Präparation geblotteter Proteine von der Nitrocellulosemembran für die Aminosäurenanalyse

Der wesentliche Schritt dieser Präparation, die TFA-Elution, erfolgte nach dem Hinweis (Brand und von Holt, 1986), daß eine solche möglich sei.

Die nach 3.1.9. auf die Nitrocellulosemembran geblotteten Proteine wurden wie folgt präpariert:

Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst mit 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) Amido-Schwarz, (Fa. SERVA, Heidelberg) für 5 min gefärbt und anschließend in 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Methanol für 10 min entfärbt.

Calmodulin: Die gefärbte Proteinbande wurde ausgeschnitten und weiter bearbeitet (siehe unten).

Radioaktives Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat: Zur Bestimmung der radioaktiven Konjugatbanden wurde ein Autoradiogramm von der gefärbten Nitrocellulose-Membran nach 3.2.9. angefertigt. Die Expositionszeit betrug 12 Stunden.

Aus dem Röntgenfilm, auf dem die Lage der Blottembran mar-

kiert war, wurde die geschwärzte Bande des Konjugates 1. Ordnung ausgeschnitten und der so vorbereitete Film als Schablone für das Ausschneiden der radioaktiven Bande aus der Blotmembran benutzt. Die Höhe der ausgeschnittenen Bande betrug ca. 8 mm. Somit ergab sich eine Fläche von $0,7 \text{ cm}^2$ pro Bahn.

Kontrollansätze ohne Calmodulin: Es wurde der Bereich zwischen 26 kDa und ca. 30 kDa aus der gefärbten Membran ausgeschnitten und weiter bearbeitet.

Die ausgeschnittene Membran wurde mit dem Blottpuffer (siehe 3.1.9) gewaschen. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Stücke einzeln in einen Büchner-Trichter gelegt, mit $0,2 \text{ ml}$ Blottpuffer/ $0,7 \text{ cm}^2$ überschichtet und die Flüssigkeit über Blaubandfilter (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel) abgenutscht. Dieser Vorgang wiederholte sich unter Wenden der Membran.

Die gewaschene Membran wurde danach in ein Glasreagenzröhrchen überführt und mit $0,25 \text{ ml/cm}^2$ Trifluoressigsäure (freie Säure, Fa. Sigma, München) für 30 min bei Raumtemperatur überschichtet. Nach der Elution der Proteine wurde die Flüssigkeit in ein weiteres Glasgefäß pipettiert und die Lösung im Exsikkator bis zur Trockne eingengt. Das Pellet zeigte eine Braunfärbung. Um diese zu entfernen, wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Hierzu wurde das Pellet in $0,5 \text{ ml}$ aqua bidest gelöst und danach das gleiche Volumen TCA (10 % w/v) hinzupipettiert. Die Lösung stand 30 min auf Eis und wurde hernach abzentrifugiert (10 min, 6000 g). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde für die Aminosäurenanalyse benutzt.

3.1.11. Affinitätschromatographische Reinigung des Calmodulin-Konjugates

Es handelt sich hierbei um eine Calcium-abhängige Affinitätschromatographie mit Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose), wie sie bei der Isolierung des Calmodulins eingesetzt wird (Rochette-EGLY et al., 1982).

Das Säulenchromatographieverfahren wurde nur zur Demonstration des Verhaltens des Calmodulin-Konjugates an der FP-Sepharose (4.3.3.3.1.) eingesetzt. Ansonsten wurde zur Reinigung des Konjugates das Batch-Verfahren angewandt (siehe 3.2.4.2.).

Die Ubiquitinierung des Calmodulins (0,9 mg/ml) wurde nach 3.2.3. ausgeführt. Das Volumen des Ansatzes betrug 0,1 ml. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 16,5 % (v/v) Mercaptoethanol (Endkonzentration). Anschließend wurde der Ansatz mit Puffer I (20 mM Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid pH 7,0) 1:5 verdünnt und auf die Säule aufgetragen.

Die Säulenmaße betrugen 0,65 cm * 0,7 cm, die Pumpgeschwindigkeit 9 ml/Stunde, das Fraktionsvolumen 0,3 ml. Das Verhältnis von aufgetragenem Calmodulin zum Gelvolumen betrug 0,5 g/l. Die FP-Sepharose wurde zuvor in Puffer I äquilibriert.

Anschließend erfolgte eine Waschung mit Puffer I (15 Gelvolumina), daran schloß sich eine weitere Waschung mit Puffer II (20 mM Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid, 300 mM NaCl pH 7,0) (12 Gelvolumina) an.

Die Elution wurde mit Puffer III (20 mM Glycerophosphat, 10 mM EGTA, 300 mM NaCl pH 7,0) ausgeführt. Nachdem sich keine Radioaktivität mehr eluieren ließ, wurde der Puffer mit aqua bidest ausgewaschen und die restliche Radioaktivität mit 1 % (w/v) SDS eluiert.

3.2. Analytische Methoden

3.2.1. Bestimmung der Enzymaktivität der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease

3.2.1.1. Durchführung

Diese Methode beruhte auf der Freisetzung TCA-löslicher Radioaktivität aus dem Substrat ^{125}J -BSA (Diechanover et al., 1978; Gehrke und Jennissen, 1987).

Hierbei wurde zwischen einer ATP-abhängigen Proteolyse in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 und einer ATP-unabhängigen Proteolyse in Gegenwart von 5 mM EDTA unterschieden. Der Chelator EDTA hob durch die Bindung des zweiwertigen Mg^{2+} -Ions die eventuell endogen vorhandenen $\text{ATP}/\text{Mg}^{2+}$ -Komplexe auf. Die Differenz dieser beiden Werte wurde als Netto-ATP-abhängige Proteolyse bezeichnet.

Der Inkubationsansatz (0,2 ml) setzte sich wie folgt zusammen:

Lösung	Stammkonz.	+ATP (ml)	-ATP (ml)
Tris/HCl pH 8,0	1 M	0,01	0,01
DTE	25 mM		
MgCl_2	100 mM	0,01	-
ATP	100 mM		
EDTA	100 mM	-	0,01
aqua bidest		0,06	0,06
Enzymlösung		0,1	0,1
^{125}J -BSA (10^7 cpm/mg)	0,11 mg/ml	0,02	0,02

Wurde die über DEAE-Sephacel angereicherte und damit Ubiquitin freie Protease (= "APF II") als Enzymlösung eingesetzt, so war der Zusatz von Ubiquitin (0,1 mg/ml Endkonzentration) nötig. Das Volumen des Inkubationsansatzes wurde durch die entsprechende Reduktion des zugesetzten Volumens an aqua bidest konstant gehalten.

Der Reaktionsstart erfolgte mit dem Substrat. Die Inkubation wurde bei 37° C für 60 min ausgeführt.

Zur Feststellung der TCA-löslichen Radioaktivität wurden dem Ansatz 0,25 ml 10 % (w/v) TCA und 0,05 ml 3 % (w/v) BSA zugesetzt und dieser hernach für 30 min auf Eis gelagert. Nach 2-minütiger Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge 3200 (Fa. Eppendorf, Hamburg) erfolgte die Radioaktivitätsmessung des Überstandes.

3.2.1.2. Definition der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde in Proteolyse-Units nach Jennissen (unveröffentlicht) angegeben:

eine Proteolyse-Unit entspricht der Proteolyse von 1 % des Substrates in einer Minute pro ml Enzymlösung.

Die spezifische Aktivität gibt die Proteolyse-Units pro mg Protein an.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{(RA_E - RA_N) * \text{Enzymverd\u00fcnnung}}{RA_T * \text{Ansatzvolumen} * 60 \text{ min}} = \text{Enzymaktivit\u00e4t in Units/ml}$$

RA_E = Radioaktivit\u00e4t des s\u00e4urel\u00f6slichen Anteils bei Inkubation mit Enzym

RA_N = Radioaktivit\u00e4t des s\u00e4urel\u00f6slichen Anteils bei Inkubation ohne Enzym

RA_T = TCA-f\u00e4llbare Gesamtradioaktivit\u00e4t des zugesetzten Substrates (=100 %-Wert)

Es konnte zwischen einer ATP-abhängigen Proteolyse ohne EDTA und einer ATP-unabhängigen Proteolyse mit EDTA unterschieden werden (Gehrke und Jennissen, 1987). Die Differenz dieser beiden Werte wurde Netto-ATP-abhängige Proteolyse genannt und war ein Maß für die reine Aktivität der ATP-abhängigen Protease in der Enzymlösung (Gehrke, 1987). Der ATP-Quotient aus der Division der ATP-abhängigen und der ATP-unabhängigen Proteolyse gab die X-fache Steigerung der Degradation in Gegenwart von ATP an. Zur Umrechnung der neu definierten Proteolyse-Unit auf die arbiträren Units nach Gehrke und Jennissen (1987) gilt:
eine Proteolyse-Unit entspricht zwölf arbiträren Units.

3.2.2. Nachweis der Ubiquitinierungsaktivität

Die Methode nach Ciechanover et al. (1984) und Gehrke und Jennissen (1987) beruhte auf dem kovalenten Einbau von ^{125}J -Ubiquitin in endogene Proteine.

Die Ubiquitinierung erfolgte in Gegenwart von ATP/Mg^{2+} . Zum Nachweis der ATP-Abhängigkeit wurden Kontrollen mit EDTA und ohne ATP-regenerierendes System durchgeführt. Der Ansatz enthielt 6,4 mg/ml Lysatprotein als Endkonzentration. Wurde die angereicherte Ubiquitin-konjugierende-Aktivität eingesetzt, so wurde im Falle des APF II 0,88 mg/ml und im Falle der affinitätschromatographisch angereicherten UCA 0,25 mg/ml als Endkonzentration zugesetzt.

Das Inkubationsvolumen wurde hierbei durch Variation des zugesetzten Volumens an aqua bidest konstant gehalten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Kochen in Probenpuffer nach Laemmli (1970) gestoppt. In der Regel war das Verhältnis von Probe zu Puffer 3:7. Abweichungen hiervon sind in den Legenden der Abbildungen vermerkt.

Die Inkubationsansätze wurden danach SDS-gelelektrophoretisch bei 15 % (w/v) Polyacrylamidkonzentration aufgetrennt und anschließend Autoradiogramme der ungetrockneten Gele nach 3.2.9. angefertigt. Der kovalente Einbau des Ubiquitins wurde durch Radioaktivitätsbanden angezeigt, die eine höhere molekulare Masse als das Ubiquitin (5,7 kDA) aufwiesen.

Der Ansatz mit 0,1 ml Gesamtvolumen hatte für das Reticulozytenlysate als Enzymlösung folgende Zusammensetzung:

Lösung	Stammkonz.	+ATP (ml)	-ATP (ml)
Tris/HCl pH 8,0	500 mM	0,01	-
DTE	10 mM		
MgCl ₂	50 mM		
ATP	10 mM		
Tris/HCl pH 8,0	500 mM	-	0,01
DTE	10 mM		
EDTA	200 mM	-	0,005
aqua bidest		0,036	0,051
Phosphokreatin	100 mM	0,01	-
Kreatinkinase	1 mg/ml	0,01	-
Lysat	26,5 mg/ml	0,024	0,024
¹²⁵ I-Ubiquitin	0,47 mg/ml	0,01	0,01

3.2.3. Nachweis der Ubiquitinierung ausgewählter Substratproteine

Hierzu wurden die Substratproteine (ox. RNase nach Hershko et al., 1983; Lysozym nach Hershko et al., 1980; Calmodulin nach Gehrke et al., 1987) dem Ubiquitinierungsansatz nach 3.2.2. unter Wahrung der Volumenkonstanz in Konzentrationen von 0,13–2,5 mg/ml je nach Protein (die einzelnen Konzentrationen sind in den Legenden der Abbildungen vermerkt) zugesetzt. Danach wurde in der nach 3.2.2. beschriebenen Weise vorgegangen.

Die Ubiquitin-Substrat-Konjugate (=Konjugate) wurden nach ihren Molekulargewichten, für jedes Substratprotein getrennt, in Ordnungen eingeteilt. Das Konjugat eines Proteins, das das geringste Molekulargewicht aufwies, wurde als Konjugat 1. Ordnung bezeichnet.

3.2.4. Bestimmung der Enzymaktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität

Die Methode beruhte auf der Messung des kovalenten Einbaus von ^{125}J -Ubiquitin in Substratproteine.

3.2.4.1. Autoradiographische Methode

Hierbei wurde der Einbau des ^{125}J -Ubiquitins aufgrund der Schwärzung eines Röntgenfilmes bestimmt.

Die Ubiquitinierung ausgewählter Substratproteine wurde nach 3.2.3. und die elektrophoretische Auftrennung dieser Ansätze nach 3.2.2. ausgeführt. Anschließend wurden Autoradiogramme unter den für die Eichung geltenden Bedingungen angefertigt und ausgewertet.

Zur Quantifizierung wurden Eichgeraden erstellt.

Hierzu wurden spezifische Mengen (3800 – 63000 cpm) an ^{125}J -Ubiquitin ($2,67 \cdot 10^9$ cpm/mg) ebenfalls der SDS-Poly-

acrylamidgelelektrophorese (lineares Gradientengel 4-20 %) unterworfen und anschließend Autoradiogramme dieses Gels bei Expositionszeiten von 15 bzw. 48 Stunden nach 3.2.9. angefertigt. Die Entwicklung des Röntgenfilmes erfolgte stets für 3 min bei 4° C, die anschließende Fixierung für 5 min.

Die erhaltene Schwärzung wurde mit Hilfe des Laser Densitometers (Ultrascan Laser Densitometer 2202, Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg) gemessen und die Peakfläche graphisch bestimmt. Für die Eichgerade nach 15 Stunden Expositionszeit wurde eine OD von 2, für die nach 48 Stunden eine von 3 gewählt. Das Verhältnis von Schreiber- zu Scangeschwindigkeit betrug 1:0,75.

Abbildung 1 zeigt, daß unter den gewählten Parametern eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Peakfläche und dem der aufgetragenen Radioaktivität besteht. Das Bestimmtheitsmaß für die Eichgeraden der beiden Expositionszeiten war mindestens 0,98.

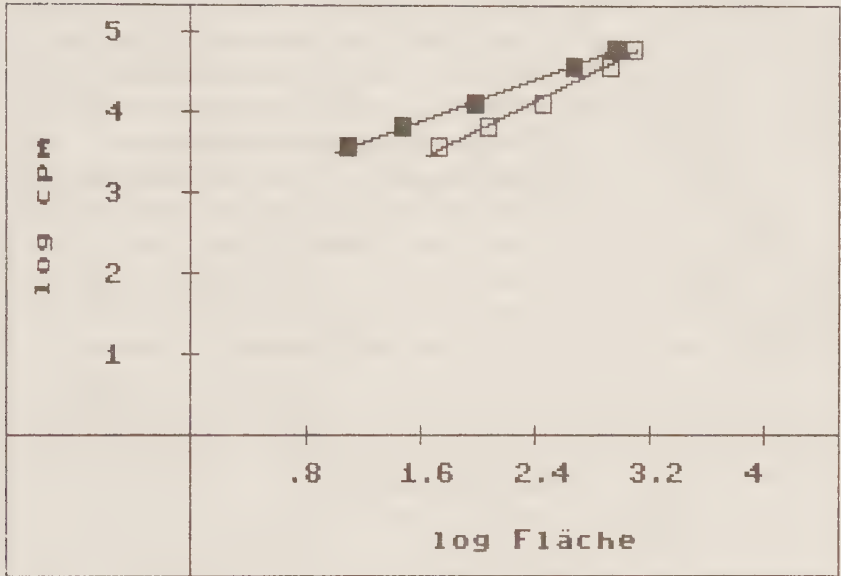
Die Schwärzung der Konjugatbanden wurde unter identischen Bedingungen bestimmt und die Radioaktivität anhand der Eichgeraden ermittelt.

3.2.4.2. Affinitätsadsorption (FP-Test)

Sie beruhte auf der Anreicherung von Calmodulin-Ubiquitin-Konjugaten aus dem Inkubationsansatz durch eine Calcium-abhängige Affinitätsadsorption an Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose). Dieses Verfahren wird zur Reinigung des Calmodulins angewandt (Rochette-Egly et al., 1982).

Die Ubiquitinierung von Calmodulin wurde nach 3.2.2 durchgeführt, wobei 0,5 mg/ml Calmodulin zugesetzt wurde. Im Unterschied zu 3.2.2. wurde jedoch die Reaktion nach 60 Minuten durch Erhitzen auf 95° C für 5 min gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend mit 0,5 ml 20 mM Glycero-

Abbildung 1: Eichgeraden für die autoradiographische Methode



Spezifische Mengen (3800 - 63000 cpm) an ^{125}J -Ubiquitin ($2,67 \cdot 10^9$ cpm/mg) wurden der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) (lineares Gradientengel 4-20 %) unterworfen und anschließend Autoradiogramme dieses Geles bei Expositionszeiten von 15 bzw. 48 Stunden nach 3.2.9. angefertigt. Die Schwärzung der Radioaktivitätsbanden wurden mit dem Laser Densitometer (Ultrascan Laser Densitometer 2202, Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg) bestimmt. Der Logarithmus der erhaltenen Peakflächen wurde gegen den Logarithmus der eingesetzten Radioaktivitäten (3800-63000 cpm) aufgetragen.

Die Entwicklung des Röntgenfilmes erfolgte stets für 3 min bei 4°C , die anschließende Fixierung für 5 min. Das Bestimmtheitsmaß für beide Geraden betrug mindestens 0,98.

geschlossene Quadrate = 15 std Expositionszeit (OD=2)
offene Quadrate = 48 std Expositionszeit (OD=3)

phosphat, 1 mM Calciumchlorid pH 7,0 (Puffer A) verdünnt und sofort für weitere 5 min auf Eis gelagert, gefolgt von einer Zentrifugation (2 min) mit der Eppendorf-Tischzentrifuge 3200 (Fa. Eppendorf, Hamburg) zur Abtrennung der denaturierten Proteine. Der klare Überstand wurde in ein zweites Eppendorf-Reagenzgefäß (1,5 ml; Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert und das Kochpellet nochmals in 0,5 ml Puffer A aufgerührt, woran sich eine Wiederholung der Zentrifugation und des Abpipettierens anschloß. Die nun insgesamt 1,1 ml des Kochüberstandes wurden zur Sicherheit nochmals zentrifugiert und in ein neues mit BSA beschichtetes Reagenzgefäß überführt.

Diese Beschichtung war notwendig, um eine unspezifische Adsorption des Ubiquitins an die Gefäßwandung zu verhindern.

Nach der Zugabe von 0,013 ml 10 mM Calciumchlorid pH 7,0 wurde in Puffer A äquilibrierte Fluphenazin-Sepharose (1 ml gepacktes Gel/mg Calmodulin) zupipettiert.

Unter mehrmaligem Aufrühren des Geles mit dem Whirl-Mix wurde der Ansatz nach 5 min für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser ersten Waschung (Wasch I) schloß sich eine zweimalige Waschung (Wasch II) mit je 1 ml 20 mM Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid, 300 mM NaCl pH 7,0 (Puffer B) nach obigem Schema an, wobei allerdings nach Zugabe der Flüssigkeit nur kurz mit dem Whirl-Mix aufgerührt wurde.

Zur Desorption erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 20 mM Glycero-phosphat, 10 mM EGTA, 300 mM NaCl pH 7,0 (Puffer C). Die Lösung konnte 5 min unter mehrmaligem Aufrühren einwirken und wurde darauf nach einer Zentrifugation des Ansatzes abpipettiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei die Zentrifugation beim zweiten Mal sofort nach Flüssigkeitszugabe, beim dritten Mal erst nach 15 min durchgeführt wurde. Abschließend wurde ein viertes Mal mit Puffer C eluiert, der jedoch 0,5 M NaCl enthielt.

Die EGTA-Überstände (EGTA-Eluat) eines Ansatzes wurden zu-

sammengefaßt und im Gamma-Zähler gezählt.

Bei den Kontrollansätzen, die zur Bestimmung der unspezifischen EGTA-eluierbaren Radioaktivität 5 mM EDTA enthielten, wurde vor dem Zusatz der Fluphenazin-Sepharose ein Ausgleich mit Calciumchlorid vorgenommen, so daß im Kochüberstand ein Überschuß von 1 mM Calciumchlorid vorlag.

Bei den Versuchen zur Calcium-abhängigen Ubiquitinierung des Calmodulins, wo EGTA zum Einsatz kam, wurde auf gleiche Weise vorgegangen.

3.2.4.3. Definition der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde in Ubiquitinierungs-Units (U-Units) nach Hershko et al. (1983) angegeben: eine Ubiquitinierungs-Unit entspricht dem kovalenten Einbau von einem μMol ^{125}J -Ubiquitin in einer Minute pro ml Enzymlösung unter den angewandten Bedingungen.

Für die autoradiographische Methode erfolgte die Berechnung nach folgender Formel (Formel I):

$$\frac{\text{RA}_B \cdot \text{Enzymverdünnung}}{\text{spez. RA}_U \cdot 60 \text{ min} \cdot \text{Ansatzvolumen}} = \text{Enzymaktivität in Units/ml}$$

RA_B = Radioaktivität der Konjugatbande
 spez RA_U = spezifische Radioaktivität des ^{125}J -Ubiquitins (cpm/ μMol)

Für die Affinitätsadsorption (FP-Test) erfolgte sie nach folgender Formel (Formel II):

$$\frac{(RA_P - RA_K) \cdot \text{Enzymverdünnung}}{\text{spez. } RA_U \cdot 60 \text{ min} \cdot \text{Ansatzvolumen}} = \text{Enzymaktivität in Units/ml}$$

RA_P = Radioaktivität des EGTA-Eluates einer Probe
 RA_K = Radioaktivität des EGTA-Eluates eines Kontrollansatzes (siehe unten)
spez. RA_U = spezifische Radioaktivität des ^{125}J -Ubiquitins (cpm/ μMol)

Zur Ermittlung der unspezifischen Radioaktivität in den EGTA-Eluaten, d.h. der Radioaktivität der EGTA-Eluate, die nicht auf Calmodulinkonjugate zurückzuführen war, waren zwei unterschiedliche Kontrollen möglich:

1. Kontrollansätze mit Calmodulin, aber ohne ATP/Mg^{2+} (keine Ubiquitinierung möglich)
2. Kontrollansätze ohne Calmodulin, aber mit ATP/Mg^{2+} (Ubiquitinierung endogener Lysatproteine möglich).

Erfolgte die Berechnung nach Formel II mit Kontrollansätzen mit Calmodulin aber ohne ATP/Mg^{2+} , so wurde der ermittelte Wert als ATP-abhängige Ubiquitinierung bezeichnet.

Erfolgte die Berechnung nach Formel II mit Kontrollansätzen ohne Calmodulin aber mit ATP/Mg^{2+} , so wurde der ermittelte Wert als Calmodulin-abhängige Ubiquitinierung bezeichnet.

Im ersten Fall besteht die Möglichkeit, daß endogene Proteine, die an die FP-Sepharose Calcium-abhängig binden könnten, ebenfalls miterfaßt werden. Deren Menge ist jedoch zu vernachlässigen (siehe Abb. 15, 17)). Zudem zeigt Abb. 17, daß die Werte beider Kontrollen beinahe identisch sind.

3.2.5. Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase

Diese Bestimmung erfolgte im automatischen Test nach Jennissen et al., 1985, modifiziert nach Jennissen und Heilmeyer (1974) und wurde freundlicher Weise von Frau G. Botzet durchgeführt.

Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde mit 133 nkat/mg ermittelt.

Der Quotient der Aktivitäten bei pH 6,8 und pH 8,2 betrug ca. 0,04.

3.2.6. Bestimmung der biologischen Aktivität des Calmodulins

Sie wurde mit Hilfe der Aktivierung der Phosphorylase Kinase im automatischen Test nach Cohen (1980) und Böhm und Jennissen (1985) ermittelt. Die Durchführung erfolgte ebenfalls durch Frau G. Botzet.

Die K_m -Werte der eingesetzten Calmoduline lagen zwischen 23-39 nM.

3.2.7. Proteinbestimmung im automatisierten Test nach
Lowry et al. (1951)

Enthielt die Probenlösung die Bestimmungsmethode störende Substanzen (z.B. Mercaptoethanol, DTE oder EGTA), so wurden die Proteine vor der Bestimmung mit 10 % TCA gefällt (Endkonzentration von 5 % TCA, 20 min bei 0° C)). Nach der Zentrifugation (2 min) in der Eppendorf-Zentrifuge 3200 (Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde der Niederschlag in 1 % SDS, 0,1 N NaOH aufgenommen. Von dieser Stammlösung wurden dann mehrere Verdünnungen angefertigt und später der Mittelwert, der sich hieraus ergebenden Proteinkonzentrationen gebildet. Die Durchführung des Proteintestes erfolgte im Autoanalyzer II (Technikon, Bad Vilbel).

Ein Aliquot der Proteinprobe wurde bei Raumtemperatur mit einem gleichen Volumen 0,1 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 0,24 % (w/v) Dinatriumtartrat $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ vermischt. Eine Minute später erfolgte der Zusatz eines 4,25-fachen Volumens an 0,2 N NaOH, 2,12 % (w/v) Na_2CO_3 , nach einer weiteren Minute der Zusatz eines gleichen Volumens an Folin-Ciocalteau-Reagenz (1:4 verdünnt, Merck, Darmstadt). Nach fünf Minuten wurde die Extinktion bei 660 nm (im Durchflußphotometer) bestimmt.

Die Eichung des automatischen Tests erfolgte für jede Messung mit zwei BSA-Standards (0,05 und 0,1 mg/ml) vor den zu messenden Proben und zwei dahinter. Aus diesen bildete man den zur Berechnung der Proteinkonzentrationen benötigten Mittelwert der Standards.

3.2.8. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

3.2.8.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Lösungen:

- 1) 30% (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Methylenbisacrylamid
- 2) 1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
- 3) 0,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
- 4) TEMED
- 5) 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (frisch angesetzt)

Die Ansätze für Gele unterschiedlicher Polyacrylamidkonzentrationen setzten sich wie folgt zusammen:

Lösung	Polyacrylamid-Konz.		
	4,5 %*	12,5 %	15 %
1)	3 ml	16,7 ml	20 ml
2)	/	10 ml	10 ml
3)	5 ml	/	/
4)	0,02 ml	0,03 ml	0,03 ml
5)	0,05 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	12 ml	13,17 ml	9,87 ml
	-----	-----	-----
Summe	20 ml	40 ml	40 ml

* Diese Konzentration wurde ausschließlich für das Sammelgel benötigt.

Die Lösungen wurden in die vertikale Gelelektrophoresekammer (System Protean der Fa. Biorad, München) überführt.

Hierzu füllte man zunächst, nach mehrmaligem Entgasen im Wasserstrahlvakuum, die Trenngelmischung ein, überschichtete mit Wasser und ließ das Gel polymerisieren.

Anschließend wurde das Sammelgel darüber polymerisiert und vorsichtig, ohne Blasenbildung, der Kamm zwischen die Platten in die Gelmischung eingesetzt.

Die Glasplatten hatten die Maße 10 x 18 cm. Der Abstand zwischen den Platten betrug 1,5 mm. Sämtliche Abstandshalter, sowie der Elektrophorese-Kamm bestanden aus Makrolon und wurden in der hiesigen Werkstatt nach eigenen Wünschen und Maßen angefertigt.

Der taschenbildende Elektrophorese-Kamm besaß 16 Zähne, der Zahnabstand betrug 1,6 mm, die Zahnbreite war 6,6 mm und die Zahntiefe betrug 14,8 mm. Damit ergab sich ein theoretisches Schachtvolumen von 0,147 ml. In der Praxis paßten jedoch aufgrund der Gelschrumpfung lediglich ca. 0,1 ml in eine Geltasche.

Als Kammerpuffer diente: 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3. Die Proben wurden vor dem Auftrag 5 min bei 100° C in Probenpuffer (10 % Glycerin, 5 % ME, 2 % SDS, 0,001 % Bromphenolblau, 0,065 M Tris/HCl, pH 6,8) erhitzt.

Die Laufzeit der Gele betrug ca. 2 Stunden bei 100 mA und 300 V.

3.2.8.2. Calcium-abhängige SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen nach Williams et al. (1984)

Zur Demonstration der Calcium-abhängigen elektrophoretischen Mobilität von Calmodulin bzw. der Calmodulin-Konjugate wurde als Grundlage das System nach Laemmli (1970) benutzt. Das System nach Williams et al. unterschied sich von der zuvor beschriebenen Elektrophorese-Technik jedoch dadurch, daß der normale Laemmli-Probenpuffer gegen einen Calcium-haltigen und einen Calcium-freien Probenpuffer ausgetauscht wurden.

Der erstere hatte folgende Zusammensetzung: 10 % Glycerin, 5 % ME, 2 % SDS, 0,001 % Bromphenolblau, 0,8 mM CaCl_2 , 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8. Der Calcium-freie bestand aus den gleichen Komponenten, jedoch war das Calciumchlorid durch 10 mM EGTA ersetzt.

Zur Durchführung dieser Elektrophorese wurden drei Aliquote einer Calmodulin- bzw. einer Calmodulin-Konjugatprobe wie folgt aufgenommen: ein Aliquot in $-Ca^{2+}$ -Puffer, 2 weitere in $+Ca^{2+}$ -Puffer. Danach wurden sie in der selben Reihenfolge in die Geltaschen überführt, ein Schacht freigelassen und die nächsten drei einer anderen Probe in umgekehrter Reihenfolge aufgetragen usw.

Die Gele wurden dann unter den selben Bedingungen gefahren, wie in 3.2.8.1. zuvor beschrieben. Nach dem Anfärben zeigten sich dann "sigmoide" Banden, da die Ca^{2+} -Form des Calmodulins, die zwei Banden aufweisen konnte, weiter wandert als die Calcium-freie Form.

3.2.8.3. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 30 bis 60 min in 0,25% (w/v) Coomassie-Blau (SERVA Blue R, Fa. SERVA, Heidelberg), 50% (v/v) Methanol, 9,2% (v/v) Essigsäure gefärbt und anschließend in 7,5% (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol entfärbt und gelagert.

3.2.8.4. Dokumentation der SDS-Gele

Die entfärbten SDS-Gele wurden 10 min im Durchfluß gewässert, um die toxische und korrosive Entfärbelösung auszuspülen. Dann wurden sie auf eine Glasplatte gelegt, bis zu den Gelrändern mit schwarzen Gummimatten abgedeckt und im Durchlicht (Neonröhren, Kaltton) mit einer Kleinbildkamera mit Makroobjektiv, bei automatischer Belichtungsmessung, fotografiert (Blende: 8, 11, 16). Als Film wurde orthochromatischer, steil arbeitender Dokumentenfilm (Agfaortho 25 Professional, mit 15 DIN Empfindlichkeit, konfektioniert als Meterware Fa. AGFA-GEVAERT, Leverkusen) benutzt. Die Entwicklung sowie die Anfertigung der Positivabzüge erfolgten in einem Fotolabor.

3.2.9. Anfertigen von Autoradiogrammen

Die nicht getrockneten SDS-Gele wurden im Isotopenlabor in Polyethylenfolien eingeschweißt und auf einem Röntgenfilm (18x24 cm, Fuji RX, NIF, Fa. Fuji, Düsseldorf) mit Klebestreifen fixiert.

Zur Verkürzung der Expositionszeit (Swanstrom und Shank, 1978) wurden beidseitig Verstärkerfolien Cronex Lightning Plus (Fa. Dupont de Nemours, Neu-Isenburg) benutzt, zudem erfolgte die Exposition des Röntgenfilmes bei -80°C . Nach der Exposition von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen wurden die Planfilme unter Rotlicht bei 4°C für 3 min in dem Röntgenentwickler (Fa. Adefo, Nürnberg) gebadet und danach in Röntgen-Fixierer (Fa. Adefo, Nürnberg) fixiert. Der Film wurde nach 15-minütigem Spülen in aqua bidest an der Luft getrocknet.

Die Expositionszeit konnte durch eine Entwicklung der Röntgenfilme bei Raumtemperatur noch wesentlich verkürzt werden (ca. 4,5 Stunden). Hierbei betrug die Entwicklungszeit, je nach eingesetzter Radioaktivität und gewünschter Bandenschwärzung, maximal eine Minute.

3.2.10. Bestimmung der molekularen Massen

Die molekularen Massen der Ubiquitin-Konjugate wurden im System nach Laemmli (1970) bestimmt.

Da sämtliche Konjugate lediglich in picomolaren Mengen vorlagen, wurden die R_f -Werte anhand der Radioaktivitätsbanden bestimmt, die durch den kovalenten Einbau des ^{125}J -Ubiquitins entstanden.

Die Elektrophoresen wurden nach 3.2.8.1. bzw. 3.2.8.2. ausgeführt und danach Autoradiogramme nach 3.2.9. angefertigt, wobei zusätzlich zur Fixation der Gele der Beginn des

Trenngeles und die Laufrfront markiert wurden. Da unter Rotlicht gearbeitet wurde, erwies es sich als nützlich, wenn das Gelende mit der Laufrfront identisch war. Die R_f -Werte der Eichproteine wurden anhand der Coomassie-gefärbten Proteinbanden des Geles mit Hilfe des Laser Densitometers (Ulto Scan Laser Densitometer 2202, Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg) bestimmt und die der Konjugate anhand der Radioaktivitätsbanden des Röntgenfilmes. Die Eichgerade wurde mittels Regressionsanalyse erstellt.

Als Eichproteine fanden Verwendung:

Standardset (MW-SDS-70L Fa. Sigma, München)

Lactalbumin (14,2 kDa)

Trypsininhibitor (20,1 kDa)

Trypsinogen (25 kDa)

Carboanhydrase (29,2 kDa)

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (36 kDa)

Ovalbumin (45 kDa)

BSA (66 kDa)

Kreatinkinase (Fa. Boehringer, Mannheim): (41 kDa), Hall
und Deluca (1976)

Cytochrom c aus Pferdeherz (Fa. SERVA, Heidelberg): (12,6
kDa), Dayhoff (1972)

Beta-Kette des Insulins (Standard zur Bestimmung der moleku-
laren Masse, Fa. SERVA, Heidelberg) : (3,5 kDa)

3.2.11. Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalyse erfolgte nach der Orthophthaldialdehyd-Methode (Roth, 1971) mit Vorsäulenderivatisierung. Mit dieser Methode ist ein Nachweis des Trimethyllysins möglich (Autric et al., 1980).

Die Auftrennung des Hydrolysates wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Goldberg übernommen.

Hydrolyse der Proteine: Um störende Substanzen zu eliminieren, wurden die Proteinlösungen zunächst TCA gefällt. Danach erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 6 n HCl, 0,1 % (w/v) Phenol und eine Begasung mit Stickstoff, der sich die Hydrolyse der Proteine unter Vakuum für 24, 48 und 72 Stunden bei konstant 110° C anschloß.

Das Hydrolysat wurde danach im Exsikkator eingeeengt und in 0,5-1,5 ml 16 mM Na₂HPO₄, eingestellt mit TFA auf pH 6,95 (Puffer A), aufgenommen.

Analyse: Die Derivatisierung der Aminosäuren wurde mit dem automatischen Probennehmer und Derivatisator Deripap BT 0421 (Fa. Biotronic, Maintal) ausgeführt.

Die Auftrennung der Derivate erfolgte mit einer 3 µm Spherisorb O.D.S. II Säule (Länge 12,5 cm, Durchmesser: 4,6 mm, Fa. Grom, Herrenberg), der eine Vorsäule aus dem gleichen Material mit einer Länge von 2 cm und einem Durchmesser von ebenfalls 4,6 mm vorgeschaltet wurde.

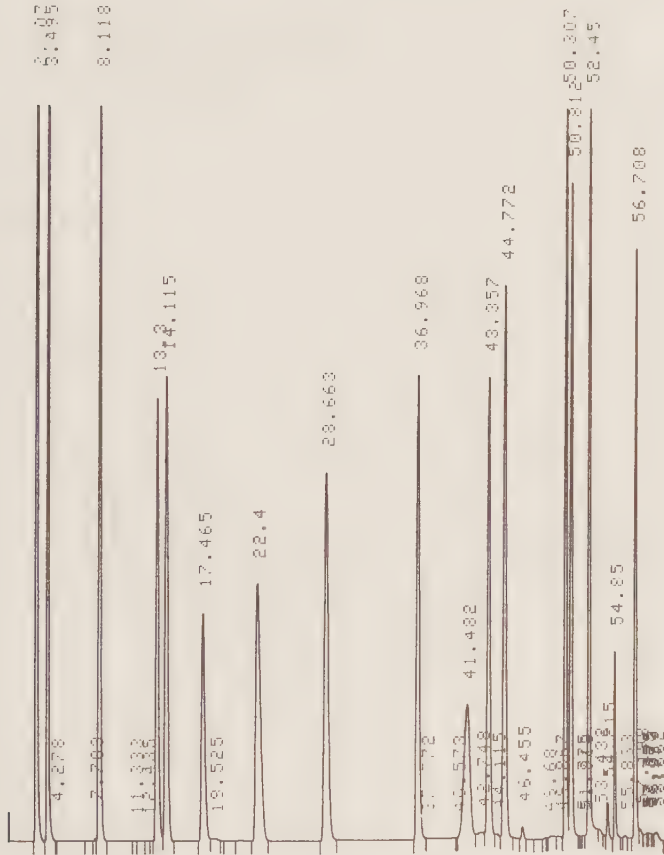
Als Gradientenbildner dienten Puffer A und Puffer B (50 % (v/v) Acetonitril, 35 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Isopropanol, 0,15 % (v/v) TFA). Die Elution der Derivate erfolgte mittels linearem Gradienten (0-60 % Puffer B, Durchfluß 0,6-1,3 ml/min, Dauer 60 min).

Die Retentionszeiten der Derivate wurde mit dem Fluoreszenzdetektor RF 530 (Anregung 350 nm, Emission 450 nm, Fa. Shimadzu, Japan) bestimmt.

Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte mit dem Integrator Chromatopac C-R 3 A (Fa. Shimadzu, Japan). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit der externen Standardmethode, wobei zur Eichung des Systems ein Aminosäurenstandardgemisch (Fa. Sigma, Taufkirchen) und N^ε-Trimethyl-L-Lysin (Fa. Calbiochem, Frankfurt) benutzt wurden.

In Abb. 2a+2b sind die Chromatogramme des Standardgemisches (Abb. 2a) und des Standardtrimethyllysins (Abb. 2b) wiedergegeben. Die Abbildungen zeigen, daß das Trimethyl-L-lysin als einzelner Peak eluiert wurde, der keine Überlappung mit anderen Aminosäuren zeigte.

Abbildung 2a: Chromatogramm des Standardgemisches für die Aminosäurenanalyse

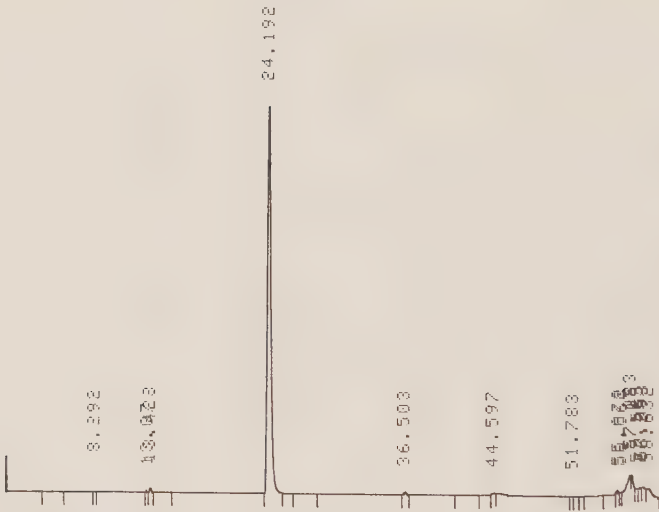


Ein Standardgemisch (4 nMol/0,1 ml je Aminosäure) wurde nach 3.2.11. aufgetrennt. Das Chromatogramm wurde mit dem Integrator Chromatopac C-R 3 A erstellt. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte auf Grund ihrer Retentionszeiten (Retentionszeiten nach Eichkurve vom 18.5.88).

ASX= 2,5 min, GLX= 3,5 min, Serin= 8,1 min, Glycin= 13,3 min, Threonin= 14,1 min, Histidin= 17,5 min, Alanin= 22,4 min, Arginin= 28,6 min, Tyrosin= 37,0 min, Valin= 43,4 min, Methionin= 44,8 min, Phenylalanin= 50,3 min, Isoleucin= 50,8 min, Leucin= 52,4 min, Lysin= 56,7 min.

Im Vergleich zu Abb. 14 wurde mit einer geringeren Empfindlichkeit aufgezeichnet, deshalb sind die Peaks hier kleiner als in Abb. 14 (Empfindlichkeit=3).

Abbildung 2b: Chromatogramm des N^ε-Trimethyl-L-Lysin als Standard für die Aminosäureanalyse



N^ε-Trimethyl-L-Lysin (4 nMol/0,1 ml) wurde einer Chromatographie nach 3.2.11. unterworfen. Die Zahl oberhalb des Trimethyllysinpeaks (24,2 min) gibt die Retentionszeit der Aminosäure an (erstellt am 18.5.88 wie Abb. 2a). Im Vergleich zu Abb. 14 wurde mit einer geringeren Empfindlichkeit aufgezeichnet (Empfindlichkeit=3). Die Bestimmung der Peakflächen wird von der Einstellung der Schreiberempfindlichkeit nicht beeinflusst.

3.2.12. Messung der Gammastrahlung von J^{125} -markierten Proteinen

Sämtliche Gammazählungen wurden in einem Gerät der Fa. Packard, Frankfurt (Auto Gamma 500) durchgeführt. Routinemäßig wurde ein Energiefenster von 15 bis 80 KeV und 1 min Zählzeit benutzt.

3.2.13. Anfärbung der Reticulozyten

Das mit Citrat versetzte Kaninchenblut (siehe 3.1.5.1) wurde mit dem gleichen Volumen Färbelösung (1 % (w/v) Brilliantkresylblau, 0,95 % (w/v) NaCl; Fa. Merck, Darmstadt) vermischt und 15 min bei Raumtemperatur gelagert (Klinisches Labor, 1974). Anschließend erfolgte das vorsichtige Ausstreichen eines Tropfens auf einem Objektträger und das Antrocknen an der Luft. Reticulozyten waren unter dem Mikroskop an dunkelblauen, knäueiförmigen inneren Strukturen bei 1000-facher Vergrößerung in blimmersion zu erkennen (Heilmeyer, 1961).

4. ERGEBNISSE

4.1. Ubiquitin

Ubiquitin wurde aus Schweineerythrozyten und -herzen isoliert.

4.1.1. Ubiquitin aus Schweineerythrozyten

4.1.1.1. Isolierung von Ubiquitin

Die einzelnen Reinigungsschritte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Durch Modifizierung der Methode nach P. Gehrke und H. P. Jennissen konnte die Ausbeute an Ubiquitin pro Liter Blut nach CM-Sephadex von 6,2 mg/l (Gehrke, 1987) auf das 3,4-fache mit 21,2 mg/l gesteigert werden.

Um noch Spuren von Verunreinigungen zu eliminieren, wurde zusätzlich mit einem Teil des Ubiquitins nach dem CM-Sephadexschritt eine Gelfiltration auf Sephadex G 50 durchgeführt. Der Reinigungsfaktor dieses Schrittes war ca. 1, was die Geringfügigkeit der Verunreinigung unterstreicht.

Der Zusatz von ^{125}I markiertem Ubiquitin erlaubte, die Effektivität der Präparation und die Anreicherung des Ubiquitins zu bestimmen. Die Anreicherung kann durch die spezifische Radioaktivität und die Ausbeute an Ubiquitin anhand der Gesamtradioaktivität ermittelt werden.

Das Polypeptid wurde ca. 500-fach angereichert, bei einer Ausbeute von ca. 3 % des ursprünglich vorhandenen Ubiquitins. Die höchste Anreicherung pro Schritt mit 128-fach wurde mittels Kochen erzielt. Ansonsten lag sie, wie zu erwarten, zwischen 1-2-fach pro Schritt.

Hinsichtlich der Gesamtanreicherung und der Ausbeute des Ubiquitins muß jedoch bedacht werden, daß sich bei dem CM-Sephadexschritt markiertes und unmarkiertes Ubiquitin nicht

Tabelle 1: Reinigungstabelle von Ubiquitin aus Schweineerythrozyten

Schritt	Volumen (ml)	Radioaktivität		Protein		Ausbeute in %		Anreicherung	
		cpm/ml	gesamt	cpm/mg	gesamt in mg	Protein	Radioaktivität pro Schritt gesamt	pro Schritt gesamt	
Blut	10235	-	-	-	314	322000	-	-	-
Erythrozyten gepackt, ungewaschen	6300	-	-	-	423	2664000	-	-	-
Lysat	9980	295	2944000	1.53	192	1918000	100	100	1
Filtrat nach Kochen	11800	115	1357000	196	.59	6900	0.36	46	128
TCA-Fällung	650	1520	988000	265	5.84	3798	0.2	73	33.6
DEAE-Cellulose	3600	191	688000	455	0.42	1512	0.078	70	23.4
Pool (Pool II) nach CM-Sephadex	29	5890	170000	785	7.5	217	0.01	25	5.8
* Pool nach Sephadex 6 50	15,6	6229	97156	756	8.23	128	0.0067	57	3,3
								0.96	493

"*": Dieser Schritt wurde nur mit einem Teil des Ubiquitins (111 mg) ausgeführt. Zur Vereinfachung der Tabelle wurden die Werte jedoch auf die gesamten 217 mg Ubiquitin des CM-Sephadexpools umgerechnet.

Die Reinigung erfolgte nach 3.1.1.. Das zugesetzte ¹²⁵I-Ubiquitin hatte eine spez. Radioaktivität von 1,264*10⁶ cpm/mg und eine Masse von 0,025 mg. Die Anreicherung des Ubiquitins wurde aus den spez. Radioaktivitäten berechnet.

gleich verhielten (siehe 4.1.1.2.1.). Da nur Pool II in der Reinigungstabelle berücksichtigt wurde, liegen die Ausbeute an Ubiquitin und die Anreicherung des Proteins im Endprodukt in Wirklichkeit höher als in der Tabelle angegeben (ca. 1,8-fach, siehe Diskussion).

4.1.1.2. Verhalten von markiertem und unmarkiertem Ubiquitin hinsichtlich der Säulenchromatographieverfahren

4.1.1.2.1. Verhalten von ^{125}Jod -Ubiquitin und unmarkiertem Ubiquitin auf CM-Sephadex

Abbildung 3 zeigt das Protein- (offene Quadrate) und Radioaktivitätsprofil (TCA-fällbar, geschlossene Quadrate) des CM-Sephadexlaufes. Die Pfeile zeigen die Grenzen der zusammengefaßten Fraktionen an.

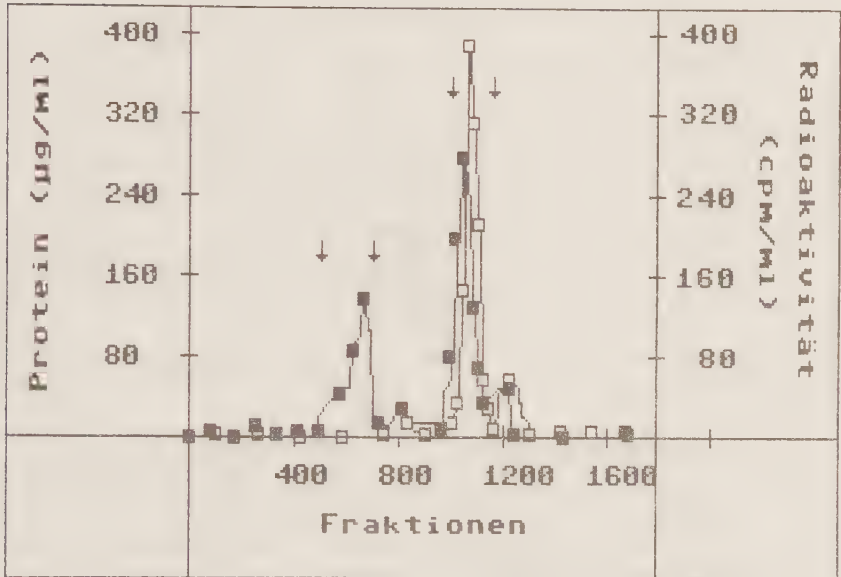
Im Durchlaufpool (Pool 1) findet der Radioaktivitätspeak (ca. 20 % der aufgetragenen Radioaktivität) keine Entsprechung im Proteinprofil. Es lief nur das radioaktiv markierte Ubiquitin durch.

Im Elutionspool (Pool 2) hingegen sind Radioaktivitäts- und Proteinpeak fast identisch. Pool 2 enthielt SDS-gelelektrophoretisch reines Ubiquitin.

4.1.1.2.2. Verhalten von ^{125}Jod -Ubiquitin und unmarkiertem Ubiquitin auf Sephadex G 50

Abbildung 4 zeigt keine Abweichung des Radioaktivitätsprofils von dem des Proteins. Jedoch war die spezifische Radioaktivität in den Peakfraktionen nicht gleich. Die höchste Radioaktivität wurde in Fraktion 45 festgestellt, dies wurde bei dem Festlegen der Poolgrenzen berücksichtigt. Das zusammengefaßte Protein war gelelektrophoretisch reines Ubiquitin.

Abbildung 3: Ionenaustauschchromatographie von angereichertem Ubiquitin mit CM-Sephadex



Diese Chromatographie wurde nach 3.1.1. ausgeführt. Die Säulenmaße betrugen 11,2 cm * 17,8 cm, die Pumpgeschwindigkeit 170 ml/h, das Fraktionsvolumen 13,8 ml. Das Verhältnis von aufgetragenem Protein zum Gelvolumen betrug 0,8 g/l. Das Gel wurde mit 3 mM Kaliumphosphatpuffer ph 6,0 äquilibriert. Die Waschung erfolgte mit 3 Gelvolumina 10 mM Kaliumphosphatpuffer. Die Elution erfolgte mit 10 Gelvolumina eines linearen KCl Gradienten (25-125 mM) ab Fraktion 500. Die Pfeile markieren die Grenzen der zusammengefaßten Fraktionen.

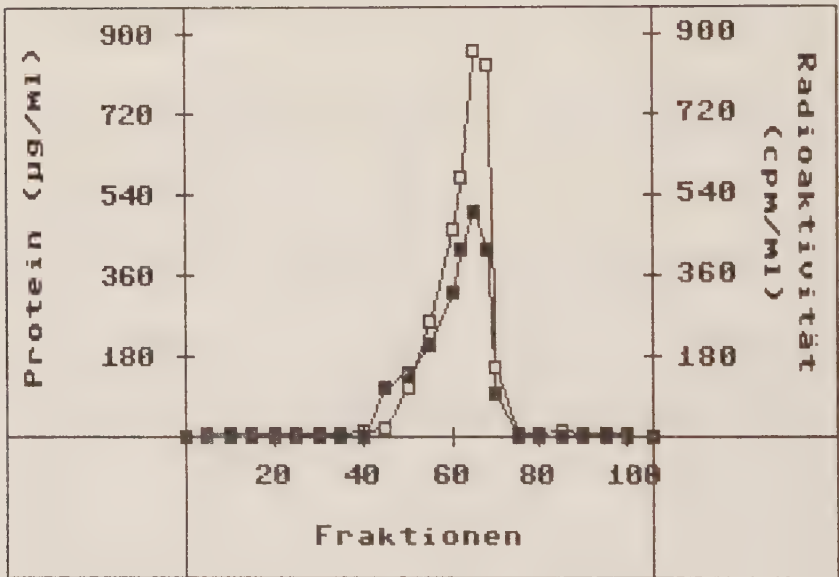
Pool 1 : Fraktion 500 - 700

Pool 2 : Fraktion 995 - 1160

TCA-fällbare Radioaktivität = ausgefüllte Quadrate

Protein = offene Quadrate

Abbildung 4: Gelfiltration des CM-Sephadexpools mit Sephadex G 50



Die Gelfiltration wurde nach 3.1.1. ausgeführt. Die Säulenmaße betrugen 5,1 * 31 cm, die Pumpgeschwindigkeit 100 ml/h, das Fraktionsvolumen 8,5 ml. Das aufgetragene Probenvolumen war 30 ml. Das Verhältnis Proben- zu Gelvolumen betrug 1:21.

Das Gel wurde mit 0,1 M Essigsäure äquilibriert. Die Chromatographie erfolgte ebenfalls in 0,1 M Essigsäure. Zusammengefaßt wurden Fraktion 45 - 70.

TCA-fällbare Radioaktivität = ausgefüllte Quadrate
 Protein = offene Quadrate

4.1.1.3. Reinheitskriterien

4.1.1.3.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Das Ubiquitin zeigt in Abb. 5 eine homogene mit Coomassie-Blau gefärbte Bande.

Obwohl Ubiquitin eine molekulare Masse von 8,5 kDa besitzt (Hershko, 1983), wurde die apparente molekulare Masse im Laemmli-System mit 5,7 kDa bestimmt. In der Literatur wird eine apparente molekulare Masse im Laemmli-System von ca. 5,5 kDa angegeben (Gehrke und Jennissen, 1987; Ciechanover et al., 1980b; Viestra et al., 1985).

4.1.1.3.2. Aminosäurenanalyse

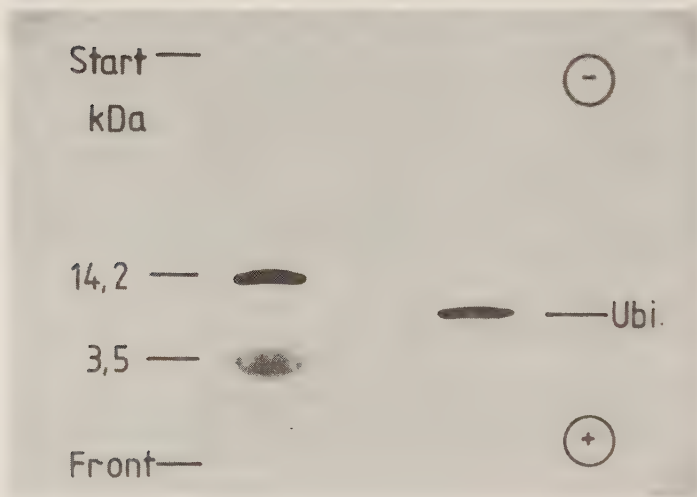
In Verbindung mit der Analyse in der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese nach Laemmli (1970) kann die Aminosäurenanalyse als weiteres Reinheitskriterium hinzugezogen werden, da hiermit signifikante Kontaminationen mit Proteinen, die im Laemmli System die gleichen Laufeigenschaften wie Ubiquitin hätten, nachgewiesen werden können.

Die Analyse des Schweineubiquitins (Tab 5, Spalte IV) stimmt innerhalb der Fehlergrenze (1-4 %, Tab. 5, Spalte V) mit den Werten der Literatur überein (Spalte VI).

Aufgrund der angewandten Methode (siehe 3.2.11.) konnten die Aminosäuren Prolin, Cystein und Tryptophan nicht bestimmt werden (Tryptophan wird bei der Hydrolyse mit HCl zerstört, Dreker et al., 1976; Cystein und Prolin können mit der Orthophthaldialdehyd-Methode nicht nachgewiesen werden, Roth, 1971).

Die Aminosäurenanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Goldberg.

Abbildung 5: Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS (Laemmli, 1970) des gereinigten Ubiquitins



Die Gelelektrophorese wurde nach 3.2.8.1. ausgeführt. Die Polyacrylamidkonzentration betrug 17,5 % (w/v).

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage von Anode und Kathode an.

linke Bahn : Standardproteine

Lactalbumin 0,02 mg (14,2 kDa)

Beta-Kette des Insulins 0,02 mg (3,5 kDa)

rechte Bahn: Ubiquitin 0,02 mg

4.1.1.4. Biologische Aktivität des Ubiquitins

Abbildung 6 zeigt die Aktivierung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease aus Reticulozyten in Abhängigkeit von der Ubiquitinkonzentration.

Die daraus bestimmte Ubiquitinkonzentration für die halb-maximale Aktivierung der Protease ist ein Maß für die biologische Aktivität des eingesetzten Ubiquitins.

Der ermittelte Wert beträgt 1,21 μ M bzw. 10,3 mg/l, was mit den Werten in der Literatur (Ciechanover et al., 1980b; Gehrke und Jennissen, 1987) von ca. 10 mg/l voll übereinstimmt.

Die Aktivierung der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse gegenüber der Kontrolle ohne Ubiquitin war 8-fach.

Die Steigerung der Proteolyse in Gegenwart von ATP um das 25,5-fache verdeutlicht die ATP-Abhängigkeit dieser Reaktion.

4.1.1.5. Poolbestimmung

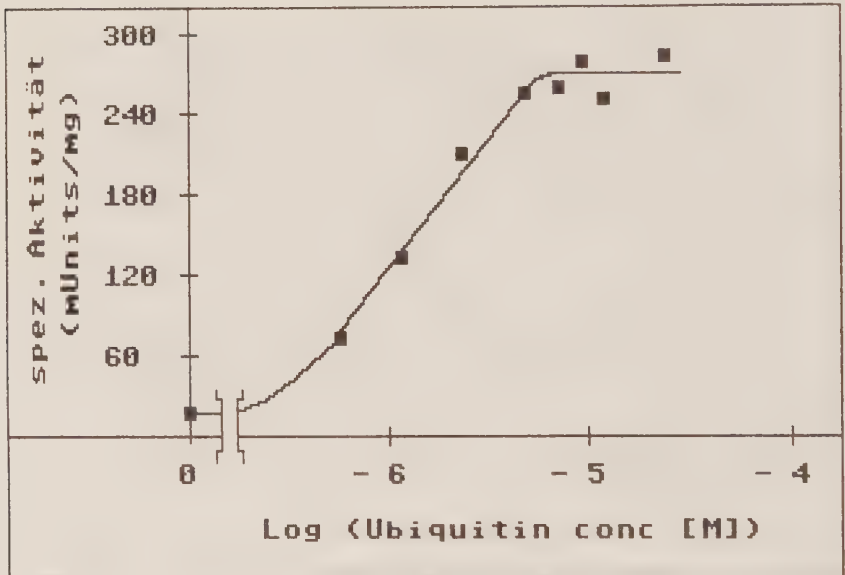
Der Zusatz eines radioaktiven Markers zu Beginn einer Präparation wird ebenfalls bei der Isotopenverdünnungsmethode angewandt.

Hierbei kann aus der Menge des zu Beginn der Präparation eingesetzten radioaktiven Proteins und dessen Verdünnungsgrad im Endprodukt die ursprünglich vorhandene Menge berechnet werden.

Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß sich markiertes und unmarkiertes Protein bei jedem Präparationsschritt gleich verhalten.

Wie aus 4.1.1.2. hervorgeht, war dies für das markierte und das unmarkierte Ubiquitin bei dem CM-Sephadexlauf nicht gegeben. Dies bewirkte, daß die spez. Radioaktivität des Elutionspools (=Pool II) um die durchgelaufene Radioaktivität (Pool I) abnahm. Da nur Pool II weiter gereinigt wurde, wurde eine zu große Verdünnung des Tracers im Endprodukt

Abbildung 6: Aktivierung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease aus Reticulozyten durch Ubiquitin.



Aufgetragen wurde die ATP-abhängige Proteolyse von ^{125}J -BSA als Funktion der Ubiquitinkonzentration.

Die über DEAE-Sephacel angereicherte Protease (nach 3.1.5.3.) wurde in folgendem Reaktionsansatz auf ihre Proteolysefähigkeit nach 3.2.1.1. getestet:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , 0,02 ml ^{125}J -BSA (0,11 mg/ml, 10^7 cpm/mg) und 0,1 ml Enzymlösung (7 mg/ml). Das Gesamtvolumen betrug 0,2 ml.

In den Kontrollansätzen zur Bestimmung der ATP-unabhängigen Proteolyse wurde 10 mM EDTA zugesetzt bzw. zur Bestimmung der Ubiquitin-unabhängigen Proteolyse wurde kein Ubiquitin zugesetzt.

Zur Definition der Proteolyse-Unit siehe 3.2.1.2..

vorgetäuscht (siehe Diskussion).

Trotz dieser Einschränkung ist eine grobe Abschätzung des Ubiquitinpools möglich.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{spez. RA}_A * M_A}{\text{spez. RA}_E * \text{Ausgangsvolumen in l}} = \text{Ubiquitin/l Blut}$$

spez. RA_A = spezifische Radioaktivität des
eingesetzten Tracers

spez. RA_E = spezifische Radioaktivität des
Endproduktes

M_A = Masse des eingesetzten Tracers

Nach obiger Formel ergab sich ein Gehalt von 0,407g Ubiquitin/l Blut. Dies entspricht bei einem mittleren Hämatokrit von 39% (Schulze et al., 1980) 1,04 g Ubiquitin/Liter Erythrozyten.

4.1.2. Ubiquitin aus Schweineherzen

Da bisher im Herzmuskel keine Ubiquitin-abhängige Proteolyse, wohl aber eine Ubiquitinierung endogener Herzproteine festgestellt wurde (Gehrke und Jennissen, 1987), und bis dato keine Arbeiten über das Vorhandensein von Ubiquitin in diesem Gewebe vorlagen, war es von Interesse, ob das Polypeptid im Herzen nachgewiesen werden konnte.

4.1.2.1. Isolierung von Ubiquitin

Tabelle 2 zeigt die Reinigung von Ubiquitin aus Schweineherzen. Die Reinigungstabelle berücksichtigt lediglich die

wasserlöslichen Proteine (=Extrakt). In dieser Fraktion fanden sich ca. 45 % des ursprünglich vorhandenen Ubiquitins. Auf Basis des Extrakts betrug die Proteinausbeute 0,018 % und die der Radioaktivität 2,2 %. Die Anreicherung war 119-fach. Die geschätzte Anreicherung aus den Herzmuskelproteinen (=Rohextrakt) war ca. 350-fach.

Die Reinheit des isolierten Ubiquitins wurde nach der SDS-Gelelektrophorese (nicht gezeigt) auf ca. 90 % geschätzt.

Abbildung 7 zeigt das Radioaktivitäts- und Proteinprofil des CM-Sephadexlaufes. Die Pfeile zeigen die Grenzen der zusammengefaßten Fraktionen. Auch hier ergaben sich Abweichungen im Verhalten des markierten und des unmarkierten Proteins.

Daraus folgt, daß die tatsächliche Anreicherung und die Ausbeute an ursprünglich vorhandenem Ubiquitin (Radioaktivitätsausbeute) höher als die angegebenen Werte anzusetzen sind.

4.1.2.2. Biologische Aktivität des Ubiquitins

Das isolierte Ubiquitin war biologisch voll aktiv. Die Ubiquitinkonzentration zur halbmaximalen Aktivierung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease aus Reticulozyten betrug 2,1 μ M bzw. 18 mg/l und stimmt gut mit den von Ciechanover et al. (1980b) angegebenen Wert von ca 10 mg/l überein.

Diese Bestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gehrke ausgeführt.

4.1.2.3. Poolbestimmung

Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, verhielten sich in dieser

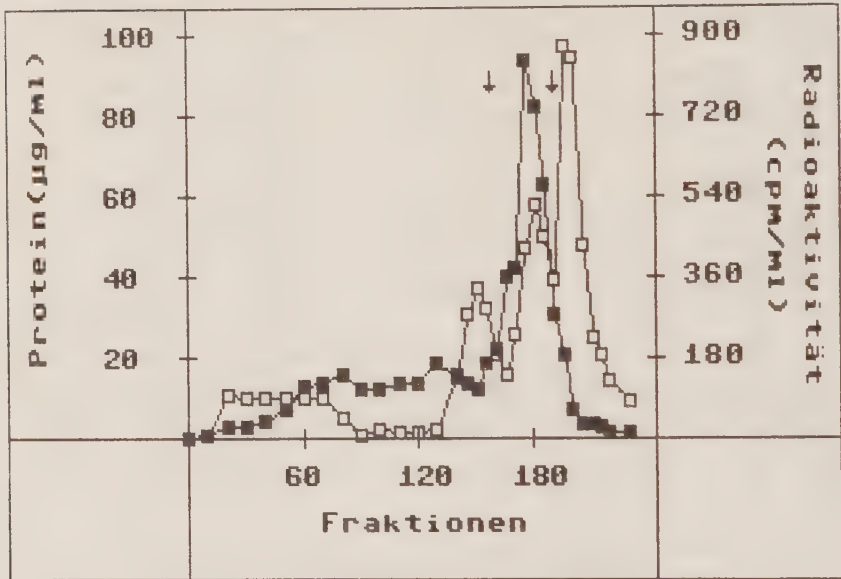
Tabelle 2: Reinigungstabelle von Ubiquitin aus Schweineherzen

Schritt	Volumen (ml)	Radioaktivität		Protein		Ausbeute in %		Anreicherung	
		cpm/ml	gesamt	cpm/mg	gesamt in mg	Protein	Radioaktivität pro Schritt	gesamt pro Schritt	gesamt
* Rohextrakt	1300	3426	4453999	44	78	101400	-	-	-
Extrakt	1000	2045	2045000	130	15.41	15410	100	100	1
Filtrat nach Kochen	1200	762	915000	2850	0.267	320	2.08	45	22
TCB-Fällung	38	11732	445000	2044	5.74	218	1.41	49	21
DEAE-Cellulose	510	637	325000	3185	0.20	101	0.66	73	15.6
Pool nach CM-Sephadex	2.0	21582	43160	15470	1.39	2.79	0.018	14	2.2
									5.65
									119

"*": die Werte dieser Zeile wurden nicht gemessen, sondern aus dem Volumen, der zugesetzten Radioaktivität und aus dem Proteingehalt des Herzens (16,9 %; Scherz et al., 1986) berechnet.

Die Reinigung erfolgte nach 3.1.2.. Die Ausgangsmasse des Herzens betrug 600 g. Das zugesetzte ^{125}J -Ubiquitin hatte eine spez. Radioaktivität von $8,098 \times 10^6$ cpm/mg und eine Masse von 0,55 mg.

Abbildung 7: Ionenaustauschchromatographie von angereicher-
tem Ubiquitin aus Schweineherzen mit CM-
Sephadex



Die Ionenaustauschchromatographie wurde nach 3.1.2. ausgeführt.

Die Säulenmaße betrugen 5,1 cm * 4,6 cm, die Pumpgeschwindigkeit 170 ml/h, das Fraktionsvolumen 8,6 ml. Das Verhältnis von aufgetragenem Protein zum Gelvolumen betrug 0,66 g/l. Das Gel wurde mit 3 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 äquilibriert. Die Waschung erfolgte mit 3 Gelvolumina 10 mM Kaliumphosphatpuffer. Die Elution erfolgte mit 11 Gelvolumina eines linearen KCl Gradienten (25-125 mM) ab Fraktion 116.

Die Pfeile markieren die Grenzen der zusammengefaßten Fraktionen.

Pool : Fraktion 170 - 190

TCA-fällbare Radioaktivität = ausgefüllte Quadrate

Protein = offene Quadrate

Präparation das markierte und das unmarkierte Ubiquitin nicht identisch. Ein Teil des Tracers lief durch. Dadurch ergab sich eine zu niedrige spez. Radioaktivität des Endpools. Obwohl somit die Voraussetzung zur Poolgrößenbestimmung mittels Isotopenverdünnungsmethode nicht gegeben war, ist doch eine grobe Abschätzung des Ubiquitinpools möglich.

Die spezifische Radioaktivität des eingesetzten Ubiquitins betrug $8,1 \cdot 10^6$ cpm/mg, die eingesetzte Masse 0,55 mg. Die spezifische Radioaktivität des Endproduktes war $1,55 \cdot 10^4$ cpm/mg. Die präparierte Herzmuskulatur hatte eine Masse von 600 g.

Bei 90 % Reinheit des Ubiquitins ergibt sich eine apparente Poolgröße von 431 mg Ubiquitin pro kg Herzmuskulatur.

4.2. Ubiquitinierung bekannter Substratproteine

Für die Darstellung der Konjugate der ox. RNase und des Lysozyms wurden Abb. 16 (Seite 106) und Abb. 22 (Seite 123) gewählt. Dies geschah deshalb, weil mit ihnen in zahlreichen Versuchen die beste Darstellung der Konjugate gelang. Da sie jedoch wichtige Aussagen über die Ubiquitinierung des Calmodulins (Abb. 16, Seite 106) und über die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (Abb. 22, Seite 123) ermöglichten, wurden die Abbildungen in diese Kapitel aufgenommen. Dies geschah auch, um wichtige Ergebnisse hier nicht vorwegzunehmen und weil die gleichen Abbildungen nicht zweimal gezeigt werden sollten.

4.2.1. Ubiquitinierung von oxidierte RNase

Hershko et al. (1983) zeigten, daß oxidierte RNase ein gutes Substrat für die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease ist.

Die Identifizierung von RNase-Ubiquitin-Konjugaten ist aufgrund des kovalenten Einbaus von ^{125}J -Ubiquitin und dessen Nachweis mittels Autoradiogramm möglich. Ubiquitin hat ein apparentes Molekulargewicht von ca. 5700, deshalb sind höhermolekulare Radioaktivitätsbanden auf diesen Einbau zurückzuführen.

Da die eingesetzten Enzymfraktionen nicht rein waren, enthielten sie noch eine Vielzahl endogener Proteine, die ebenfalls ubiquitiniert werden können. Dies wurde durch Kontrollansätze, die keines der getesteten Substratproteine enthielten, berücksichtigt.

Die Inkubation von ox. RNase und ^{125}J -Ubiquitin mit der affinitätschromatographisch angereicherten Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität führte gegenüber dem Kontrollan-

satz ohne ox. RNase zur Bildung dreier neuer Radioaktivitätsbanden mit einer Hauptbande bei 27,5 kDa (Abb. 22, Seite 123, Bahn 1). Bei Inkubation mit der nicht angereicherten Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität des Lysates (Abb. 16, Seite 106, Bahn 4,5) zeigte sich lediglich die 27,5 kDa Bande.

Die Mengen an RNase-Konjugaten sind in der Coomassie-Färbung des SDS-Gels nicht zu sehen. Sie können wegen ihrer geringen Menge nur auf dem Autoradiogramm nachgewiesen werden. Die Hauptbande (27,5 kDa) in Abb. 22, Bahn 1 (Seite 123) entspricht einer Masse von ca. 0,6 μ g, d.h. es wurden ca. 0,9 % der eingesetzten RNase ubiquitiniert.

Nach Hershko et al. (1981) sollten diese Radioaktivitätsbanden RNase-Ubiquitin-Konjugate von jeweils einem RNase-Molekül mit 1-3 Ubiquitinmolekülen repräsentieren.

Um zu überprüfen, ob es sich wirklich um Konjugate mit den oben angegeben molaren Verhältnissen handelt, wurden die molekularen Massen der RNase-Konjugate in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) bestimmt (Tab. 3).

Die ermittelten Werte können hierbei unter zwei verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden. Zum einen können Differenzen zwischen der apparenten molekularen Masse der ox. RNase und denen der einzelnen Konjugate gebildet werden, zum anderen jeweils stufenweise zwischen einem höhermolekularen Protein und dem nächsten darunterliegenden bis hinunter zur ox. RNase.

In Tabelle 3 wurden beide Gesichtspunkte berücksichtigt, wobei die stufenweise gebildeten Differenzen in Dalton und die Differenzen bezogen auf die ox. RNase als das x-fache der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins (5,7 kDa) ausgedrückt wurden.

Die stufenweise gebildeten Differenzen betrugen jeweils zwischen dem 0,9-1,1-fachen der apparenten molekularen Ubiquitinmasse.

Ebenso zeigten die Differenzen zwischen der apparenten mole-

Tabelle 3: Molekulare Massen der ox.RNase-Konjugate

Protein	apparente molekulare Masse in Dalton	Differenz zw. den Ordnungen in Dalton	Differenz (*) Konj. - ox.RNase (X-fach m Ubi =5,7 kDa)
RNAse	20800		
uRNAse 1.Ordnung	27365	6545	1,14
uRNAse 2.Ordnung	32195	4917	2,0
uRNAse 3.Ordnung	38503	6308	3,1

Die Tabelle wurde aus der Abb. 22 (Seite 123) erstellt. Die Bestimmung der molekularen Massen erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) gemäß 3.2.10.. Es wurde ein lineares Gradientengel mit 10-20 % Polyacrylamid benutzt. Als Eichproteine fanden Verwendung: Kreatinkinase (41 kDa), oxidierte RNAse (20,8 kDa), Lysozym aus Eiklar (15 kDa) und Cytochrom C aus Pferdeherzen 12,6 kDa). Die Eichgerade wurde mittels linearer Regression erstellt. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,984. Zur Definition der Konjugatordnungen siehe 3.2.3..

"*": Es wurde die Differenz zwischen den molekularen Massen der Konjugate und der ox. RNAse gebildet. Diese Differenz wurde als ein Vielfaches der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins angegeben.

kularen Masse der ox. RNase und den einzelnen Konjugaten eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Sie betrugen für das Konjugat der 1. Ordnung das 1,14-fache, für das der 2. Ordnung das 2,0-fache und für das der 3. Ordnung das 3,1-fache der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins.

Das Hauptkonjugat (27,5 kDA-Bande) wurde durch Kochen (für 5 Minuten bei 95° C) nicht ausgefällt.

Die Bindung des Ubiquitins an die RNase ist durch Kochen in Detergenzien (2 % SDS) und Reduktionsmittel (5 % Mercaptoethanol) nicht zu zerstören.

4.2.2. Ubiquitinierung von Lysozym

Ebenfalls nach Hershko et al. (1980) ist Lysozym auch ein gutes Substrat für die Ubiquitinierung.

Bei Inkubation dieses, im Gegensatz zu oxidiert RNase, nativen Proteins mit dem konjugierenden Enzymsystem sind 3 neue Radioaktivitätsbanden auf dem Autoradiogramm gegenüber der Kontrolle sichtbar. Diese Banden sind sowohl bei Inkubation mit Lysat (Abb. 16, Seite 106, Bahn 7,8) als auch mit der angereicherten Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (Abb. 22, Seite 123, Bahn 3) sichtbar.

In Tabelle 4 sind die apparenten molekularen Massen von Lysozym und dessen Konjugaten, bestimmt mittels SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970), aufgelistet.

Die Differenzen zwischen der molekularen Masse des Lysozyms und denen der einzelnen Konjugate ergeben eine bessere Übereinstimmung mit den zu erwartenden Werten, als die stufenweise gebildeten Differenzen. Für die Konjugate 1., 2. und 3. Ordnung ergeben sich nach ersterer Methode Werte vom 1,05-, 1,7- bzw. 2,8-fachen der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins.

Tabelle 4: Molekulare Massen der Lysozym-Konjugate

Protein	apparente molekulare Masse in Dalton	Differenz zw. den Ordnungen in Dalton	Differenz (*) Konj.- Lysozym (X-fach m Ubi =5,7 kDa)
Lysozym	15083		
uLys. 1.Ordnung	21110	6027	1,05
uLys. 2.Ordnung	24751	3641	1,68
uLys. 3.Ordnung	31017	6266	2,77

Die Bestimmung der molekularen Massen erfolgte aus Abb. 16 (Seite 106) mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) gemäß 3.2.10. Die Polyacrylamidkonzentration betrug 15 %.

Als Eichproteine fanden Verwendung:

Ovalbumin (45 kDa), G.-P.-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa). Die Eichgerade wurde mittels linearer Regression erstellt. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,986.

Zur Definition der Konjugatordnungen siehe 3.2.3.

"*": Es wurde die Differenz zwischen den molekularen Massen der Konjugate und des Lysozyms gebildet. Diese Differenz wurde als ein Vielfaches der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins angegeben.

4.3. Ubiquitinierung von Calmodulin (CaM)

Die Ubiquitinierung von Säugercalmodulin wurde erstmals von Gehrke et al. (1987) nachgewiesen. Sie wurde bis dahin für unmöglich gehalten (Gregori et al., 1985; siehe 2.4.).

4.3.1. Charakterisierung des eingesetzten Calmodulins

Das eingesetzte Calmodulin war SDS-gelelektrophoretisch rein. Die K_m -Werte der eingesetzten Calmoduline für die Aktivierung der Phosphorylase Kinase aus Kaninchenskelettmuskulatur betrugen zwischen 23-39 nM (siehe 3.2.6.).

Die Aminosäurenanalyse (Tab. 5, Spalte 1), die in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Goldberg erstellt wurde, erbrachte den Nachweis von einem Mol Trimethyllysin pro Mol Calmodulin. Dies war in Hinblick auf die Trimethyllysin-Hypothese (siehe 2.4.) von Gregori et al. (1985) wichtig.

Die Mittelwerte aus jeweils 3 Parallelanalysen zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden (Spalte 1) zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Werten der Sequenzanalyse (Watterson et al., 1980; Spalte 3). Die Abweichungen der gemittelten Werte von denen der Sequenzanalyse waren kleiner als 10 %. Die Standardabweichungen (Spalte 2) der einzelnen Werte von weniger als 10 %, bezogen auf die Mittelwerte, zeigen die gute Reproduzierbarkeit der Meßwerte.

Tabelle 5: Aminosäurenanalyse von Calmodulin und Ubiquitin

(Angaben in Mole Aminosäuren/Mol Protein)

Amino- säuren	Calmodulin			Ubiquitin		
	I	II	III	IV	V	VI
ASX	21.8	4,2	23	7.12	1	7
GLX	25.7	5,4	27	12.6	1,1	12
* Serin	3.69	7,5	4	3.1	1	3
Glycin	12.09	3,5	11	6.0	1,3	6
Threonin	11.56	3,7	12	7.05	1,8	7
Histidin	1.11	6,3	1	0.97	2,8	1
Alanin	11.41	1,8	11	2.15	1,4	2
TM-Lysin	1.07	8,4	1	0	-	0
Arginin	6.36	5,4	6	3.98	0,5	4
Tyrosin	2.14	3,7	2	1.02	0,6	1
Methionin	9.25	1,6	9	1.05	1	1
Valin	7.19	3,8	7	3.98	1,5	4
* Phenylalanin	7.72	6,9	8	1.81	1,1	2
Isoleucin	8.79	7,0	8	7.02	1,4	7
Leucin	9.36	2,3	9	9.04	0,8	9
Lysin	6.71	6,2	7	6.9	3,7	7
Prolin	n.d.	-	2	n.d.	-	3
Cystein	n.d.	-	0	n.d.	-	0
Tryptophan	n.d.	-	0	n.d.	-	0

Zur Durchführung der Aminosäurenanalyse siehe 3.2.11.

"n.d.": keine Bestimmung durchgeführt.

"ASX" : Asparagin und Asparaginsäure.

"GLX" : Glutamin und Glutaminsäure.

Die mit "*" gekennzeichneten Aminosäuren wurden auf den Zeitpunkt T=0 Stunden Hydrolysezeit extrapoliert.

I : Calmodulin aus Rinderhoden. Die Berechnung erfolgte unter der Berücksichtigung des nicht bestimmten Prolins mit 146 Aminosäuren pro Calmodulinmolekül (Mittelwert aus je drei Proben zu den Hydrolysezeiten 24, 48 und 72 Std.).

- II : Standardabweichung angegeben in Prozent des Mittelwertes.
- III: Werte nach der Sequenzanalyse von Hirncalmodulin (Watterson et al., 1980)
- IV : Ubiquitin aus Schweineerythrozyten. Die Berechnung erfolgte unter der Berücksichtigung des nicht bestimmten Prolins mit 73 Aminosäuren pro Ubiquitinmolekül (Mittelwert aus je drei Proben zu den Hydrolysezeiten 24, 48 und 72 Std.).
- V : Standardabweichung angegeben in Prozent des Mittelwertes.
- VI : Werte nach der Sequenzanalyse von humanem Ubiquitin (Özkaynak et al., 1984).

4.3.2. Nachweis der Calmodulin-Konjugate

Die Inkubation von Calmodulin und ^{125}J -Ubiquitin mit der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (aus Reticulozytenlysat) führte gegenüber Kontrollansätzen ohne Calmodulin zur Bildung neuer Proteinbanden in der SDS-Gelelektrophorese.

In Abb. 8 ist die elektrophoretische Auftrennung eines Ubiquitinierungsansatzes mit Calmodulin (Bahn 4) und des Kontrollansatzes ohne Calmodulin (Bahn 3), sowie der Kontrolle ohne ATP, aber mit Calmodulin (Bahn 2) gezeigt (A=Coomassie-Färbung des Gels, B=Autoradiogramm des Gels). Die Elektrophorese wurde in Gegenwart von EGTA ausgeführt. Die neugebildeten Proteinbanden sind jedoch wegen ihrer geringen Menge nur auf dem Autoradiogramm aufgrund ihres radioaktiv markierten Ubiquitinanteils sichtbar (Abb. 8 B). Im Vergleich der Ansätze mit Calmodulin (Bahn 4) und ohne Calmodulin (Bahn 3) weist der Ansatz mit Calmodulin drei neue Radioaktivitätsbanden auf, mit einer Hauptbande bei ca. 29 kDa und weiteren Banden bei 35,5 kDa und 41 kDa. Diese neuen Banden sind auf die Ubiquitinierung von Calmodulin zurückzuführen. Da bei der Abbildung Wert auf die Darstellung der Konjugate 3. Ordnung gelegt wurde, mußte ein Verschmelzen der Hauptbande und der 35,5 kDa-Bande hingenommen werden (siehe hierzu Abb. 16).

Die Möglichkeit der Polyubiquitinierung von Säugercalmodulin war bisher unbekannt.

Die Radioaktivitätsbanden, die in beiden genannten Ansätzen sichtbar sind, entstehen durch die Ubiquitinierung endogener Proteine der zugesetzten Enzymfraktion.

Die einzige Radioaktivitätsbande des Ansatzes ohne ATP rührt von freiem Ubiquitin her, da unter diesen Bedingungen keine Ubiquitinierung stattfindet.

Bei weiteren Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die Hauptbande in dem Ansatz mit Calmodulin in Wirklichkeit eine Doppelbande ist, wobei das Verschmelzen zu einer Bande

durch Überstrahlung der beiden Banden bei langen Expositionszeiten entsteht. Dieses Phänomen ist in Abbildung 16 sichtbar, wo der Röntgenfilm unter unterschiedlichen Bedingungen entwickelt wurde.

Die Doppelbandenbildung war nur in elektrophoretischen Auftrennungen in Gegenwart von EGTA deutlich zu sehen, während sie in Gegenwart von Calcium undeutlicher wurde (siehe 4.3.3.3.2.). Im EGTA-System setzte sie sich aus einem 29,6 kDa Konjugat und einem 27,5 kDa Konjugat zusammen, wobei der Anteil des 29,6 kDa stets überwog. Deshalb wurde das 29,6 kDa Konjugat als Hauptbande und das 27,5 kDa Konjugat als Nebenbande des Konjugates 1. Ordnung bezeichnet. Eine genaue Quantifizierung der Anteile mit dem Laserscanner war nicht möglich, da er die beiden Banden nicht auflösen konnte.

In Abbildung 16 wird im Vergleich mit oxidiertem RNase (Bahn 4,5) und Lysozym (Bahn 7,8) deutlich, daß Calmodulin ein gutes Substrat für das ubiquitinierende System des Retikulozytenlysates ist.

Für die Isolierung der Calmodulin-Ubiquitin-Konjugate war von Wichtigkeit, daß sie nach Erhitzen auf 95° für 5 Minuten noch in Lösung blieben.

4.3.3. Charakterisierung der Calmodulin-Ubiquitin-Konjugate

4.3.3.1. Bestimmung der molekularen Massen

Die Bestimmungen wurden mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese nach Laemmli (1970) mit EGTA-haltigem Probenpuffer durchgeführt.

Abbildung 9 zeigt die Eichgerade, die für Abbildung 8 erstellt wurde. Das Bestimmtheitsmaß dieser Geraden betrug

Abbildung 8: ATP-abhängige Bildung von Ubiquitin-Calmodulin-Konjugaten (Legende umseitig)

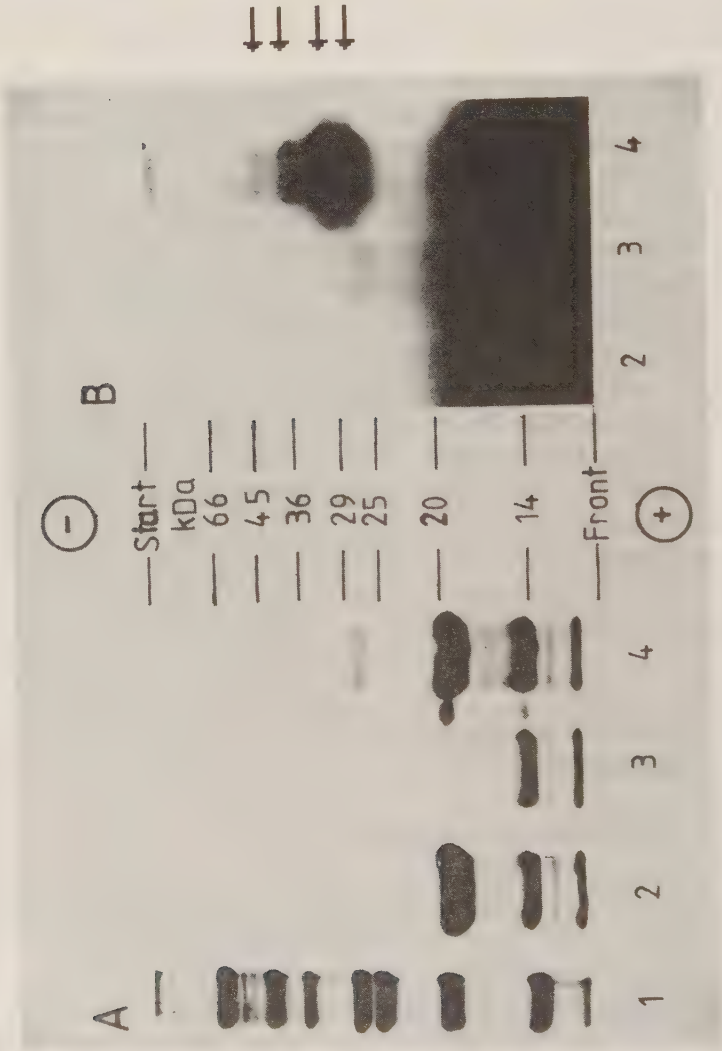


Abbildung 8: ATP-abhängige Bildung von Ubiquitin-Calmodulin-Konjugaten

Die Ubiquitinierung wurde nach 3.2.3. ausgeführt. Das eingesetzte Ubiquitin hatte eine spezifische Radioaktivität von $1,99 \cdot 10^9$ cpm/mg. Die Reaktionsansätze wurden im Unterschied zu 3.2.3. nach 60 min erhitzt (85° C, 3,5 min) und danach bei 8000*g für 2 min zentrifugiert. Die Überstände wurden TCA-gefällt und in 0,1 ml Probenpuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen, der 10 mM EGTA enthielt. Die Elektrophorese erfolgte nach 3.2.8.1. (15 % w/v Acrylamid) im Laemmli-System. Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt (Expositionszeit 24 Std., Entwicklung bei Raumtemperatur).

Die Konjugate der Ordnungen 1a und 1b sind aufgrund der Überstrahlung zu einer Radioaktivitätsbande verschmolzen, die Radioaktivitätsbande des Konjugates 2. Ordnung ist ebenfalls aufgrund der Überstrahlung nur undeutlich von der Doppelbande abgesetzt (siehe Abb. 16). Die Pfeile markieren die Lage der Calmodulin-Konjugate.

Calmodulin ist in der Coomassie-Färbung in Höhe von ca. 20 kDa zu sehen (vergl. Bahn 3 und 4). Die Schwärzung des Autoradiogramms zwischen der Front und 20 kDa ist auf das freie ^{125}J -Ubiquitin zurückzuführen. Sie geht in den Bereich bis zu 20 kDa aufgrund der starken Überbelichtung.

A: Coomassie gefärbtes Gel, B: Autoradiogramm

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

- Bahn 1: Standardproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), 6-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa)
- Bahn 2: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin (0,05 mg), ohne ATP/Mg²⁺
- Bahn 3: Ubiquitinierungsansatz ohne Calmodulin
- Bahn 4: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin (0,05 mg) + ATP/Mg²⁺

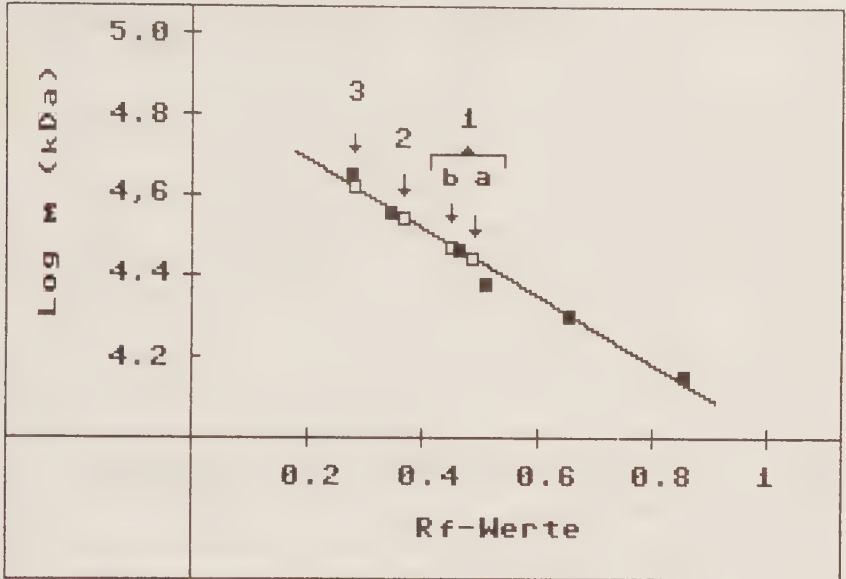
0.988. Die Eichproteine sind als ausgefüllte Quadrate, die Konjugate als offene Quadrate dargestellt.

In Tabelle 6 sind die Mittelwerte der Konjugatbanden aus 2 bzw. 3 Bestimmungen (siehe Legende) im EGTA-System aufgelistet. Die Abweichungen von den Mittelwerten betrugen für die einzelnen Konjugate in der Reihenfolge ihrer Auflistung in Tab. 6 0,26 kDa, 0,41 kDa, 0,49 kDa und 0,1 kDa.

Es bleibt anzumerken, daß bei der Besprechung der einzelnen Abbildungen stets die molekularen Massen angegeben sind, die für diese Abbildungen bestimmt wurden. Es können sich somit Abweichungen zu den Werten der Tabelle 6 ergeben.

Die Differenz zwischen den Proteinen der Doppelbande (27,5 kDa und 29,6 kDa) beträgt nur 40 % der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins. Hingegen stimmt die Differenz zwischen dem 29,6 kDa-Protein und dem Konjugat 2. Ordnung, sowie die Differenz zwischen dem Konjugat 2. Ordnung und dem der 3. Ordnung gut mit der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins überein. Aus diesem Grunde wurden das 27,5 kDa- und das 29,6 kDa-Konjugat als unterschiedliche Formen eines monoubiquitinierten Calmodulins angesehen. Daß das Calmodulin-Konjugat 1. Ordnung für ein monoubiquitinertes Calmodulin eine um ca. 4 kDa zu hohe molekulare Masse hat, wurde von anderen Autoren ebenfalls bestätigt (Gregori et al., 1985, Gregori et al., 1987).

Abbildung 9: Bestimmung der molekularen Massen mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970)



Aufgetragen wurden die R_f -Werte gegen den Logarithmus der molekularen Massen (m). Die Bestimmung der molekularen Massen erfolgte nach 3.2.10. bei einer Acrylamidkonzentration von 15 % (w/v). Die Spannung betrug 250 V, die Stromstärke 100 mA. Die Kühlung erfolgte mittels Durchflußkühlung. Als Eichproteine fanden Verwendung: Ovalbumin (45 kDa), G.-P.-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa). Die Eichgerade wurde mittels linearer Regression erstellt. Das Bestimmtheitsmaß betrug 0,988.

ausgefüllte Quadrate: Eichproteine
 offene Quadrate : Ubiquitin-Calmodulin-Konjugate
 die Zahlen geben die Konjugatordnungen an (Def.: 3.2.3.)

Tabelle 6: Molekulare Massen der Calmodulin-Konjugate in EGTA

Protein		apparente molekulare Masse in Dalton	Differenz zw. den Ordnungen in Dalton	Differenz (*) Konj.- CaM (X-fach Ubi =5,7 kDa)
CaM		19892		
uCaM 1.Ordnung	a	27456	7564-9790	1,3-1,7
	b	29615		
uCaM 2.Ordnung		35441	5826	2,7
			5946	3,8
uCaM 3.ordnung		41387		

Die Bestimmung der molekularen Massen erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) in Gegenwart von 10 mM EGTA gemäß 3.2.10. Die Polyacrylamidkonzentration betrug 15 %.

Als Eichproteine fanden Verwendung:

Ovalbumin (45 kDa), G.-P.-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa).

Die molekulare Masse des Konjugates 1. Ordnung wurde mit einer 3-fach, die der Konjugate 2. und 3. Ordnung mit einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Eichgeraden wurden mittels linearer Regression erstellt. Das Bestimmtheitsmaß betrug mindestens 0,978.

Zur Definition der Konjugatordnungen siehe 3.2.3.

"*": Es wurde die Differenz zwischen den molekularen Massen der Konjugate und des Calmodulins gebildet. Diese Differenz wurde als ein Vielfaches der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins angegeben.

4.3.3.2. Vergleich der Ubiquitinierungsralen von Calmodulin-Konjugaten 1-3. Ordnung

Die Anteile (Tab. 7) wurden mit der neu entwickelten autoradiographischen Methode bestimmt (siehe 3.2.4.1.). Die Gesamtmenge an ubiquitiniertem CaM wurde gleich 100 % gesetzt.

Während ca. 0,6 % des eingesetzten Calmodulins monoubiquitiniert werden konnte, wurden ca. 0,023 % di- und 0,005 % triubiquitiniert.

Eine Differenzierung zwischen den beiden Proteinen der Doppelbande war nicht möglich, da sich ihre Peakflächen erheblich überschneiden.

Die spezifischen Aktivitäten des ubiquitinierenden Systems wurden als apparente Units angegeben, da bisher noch keine Kinetik über die Bildung der Konjugate 2. und 3. Ordnung vorliegt (zur Definition der Aktivität des ubiquitinierenden Systems siehe 3.2.4.3.).

Tabelle 7: Vergleich der Ubiquitinierungsraten der Calmodulin-Konjugate 1.-3. Ordnung

uCaM	cpm/ 0,1 ml	Ubi/CaM	uCaM pMol/mg Lysat- protein	app. spez. Akt. nUnits/mg Lysatprotein	% Radio- aktivität	% uCaM
uCaM 1.Ordnung	40406	1:1	27.2	453,3	90,1	95,3
uCaM 2.Ordnung	3250	2:1	1.1	36,4	7,2	3,8
uCaM 3.Ordnung	1160	3:1	0.26	4,3	2,6	0.86

Die Bestimmung erfolgte mittels der autoradiographischen Methode (siehe 3.2.4.1.).

0,03 ml eines Inkubationsansatzes mit Calmodulin (0,5 mg/ml; siehe 3.2.3.), der zusätzlich 1,1 mM Calciumchlorid und 1 mM EGTA enthielt, wurden in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Die spezifische Radioaktivität des eingesetzten ¹²⁵J-Ubiquitins betrug 2335 cpm/Picomol.

Die ermittelten Werte wurden auf das Standardvolumen von 0,1 ml umgerechnet.

Die Expositionszeit des Röntgenfilmes betrug 48 Stunden bei -80° C. Die Entwicklung wurde bei 4° C für 3 Minuten ausgeführt.

Bei den Prozentangaben wurde die Gesamtradioaktivität bzw. die Gesamtmenge der Calmodulin-Konjugate gleich 100 % gesetzt (die Gesamtradioaktivität berücksichtigt den Einbau des Ubiquitins während die Gesamtkonjugatmenge den Einbau des Calmodulins in Ubiquitin-Calmodulin-Konjugate berücksichtigt).

Die Angaben der apparenten spezifischen Aktivitäten beziehen sich auf die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität (Def. 3.2.4.3.). Zur Definition der Konjugatordnungen siehe 3.2.3.

4.3.3.3. Ca^{2+} -abhängige Funktionsunterschiede

4.3.3.3.1. Verhalten des Ubiquitin-Calmodulin-Konjugates (uCaM) auf Fluphenazin-Sepharose (FP-Sepharose)

Abbildung 10 zeigt das Radioaktivitätsprofil der säulen-chromatographischen Auftrennung eines Ubiquitinierungs-ansatzes (siehe 3.1.11.) mit Calmodulin (0,09 mg) und ^{125}J -Ubiquitin auf FP-Sepharose.

Es handelt sich hierbei um eine Calcium-abhängige Affini-tätschromatographie, wie sie bei der Isolierung des Calmo-dulins eingesetzt wird (Rochette-Egly et al., 1982).

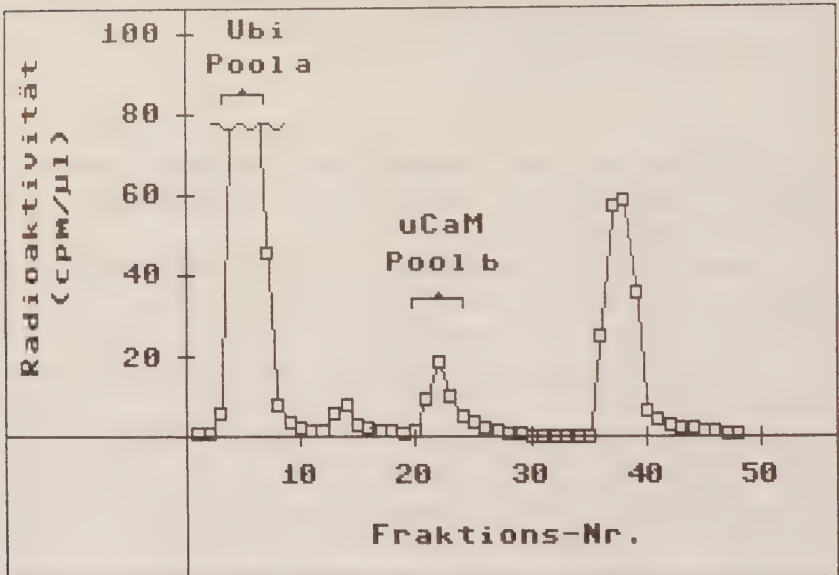
Es zeigte sich, daß Calcium-abhängig Radioaktivität eluiert werden kann.

Durch Analyse der zusammengefaßten Fraktionen von Peak a und b mittels Gelelektrophorese und anschließender Autora-diographie (Abbildung 11) konnte nachgewiesen werden, daß die EGTA eluierte Radioaktivität (Pool b, Bahn 3) ledig-lich vom Calmodulin-Konjugat herrührte. Die Radioaktivität des Durchlaufpools (Pool a, Bahn 1) resultierte hauptsäch-lich aus der des freien Ubiquitins.

Das EGTA-Eluat enthielt natürlich auch das nicht ubiquiti-nierte Calmodulin (siehe Abb. 15).

Mit diesem Versuch sollte lediglich geprüft werden, ob mit den Calmodulin-Konjugaten eine Ca^{2+} -abhängige Affini-tätschromatographie möglich ist. Die Verluste an Calmodulin-Konjugaten (vergl. Bahn 2 und 3) erklären sich zum einen dadurch, daß ein Drittel des Elutionspools bei der Erstel-lung des Radioaktivitätsprofils (TCA-Fällung) verloren wurde, zum anderen aus der Adsorption an benutzte Gerät-schaften (z.B. Schlauchsystem), da in allen Fraktionen des Chromatogrammes nur ca. 70 % der aufgetragenen Radioakti-vität gefunden wurden. Die Konjugatausbeuten konnten im Affinitätsadsorptionsverfahren (FP-Test) erhöht werden (siehe 4.3.4.).

Abbildung 10: Verhalten des Ubiquitin-Calmodulin-Konjugates auf Fluphenazin-Sepharose



Die Säulenmaße betrugen 0,65 cm * 0,7 cm, die Pumpgeschwindigkeit 9 ml/Stunde, das Fraktionsvolumen 0,3 ml. Das Verhältnis von aufgetragenem Calmodulin zum Gelvolumen betrug 0,5 g/l.

Aufgetragen wurde ein Ubiquitinierungsansatz (siehe 3.2.3.) mit Calmodulin (0,09 mg) als Substrat. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 16,5 % (v/v) Mercaptoethanol (Endkonzentration).

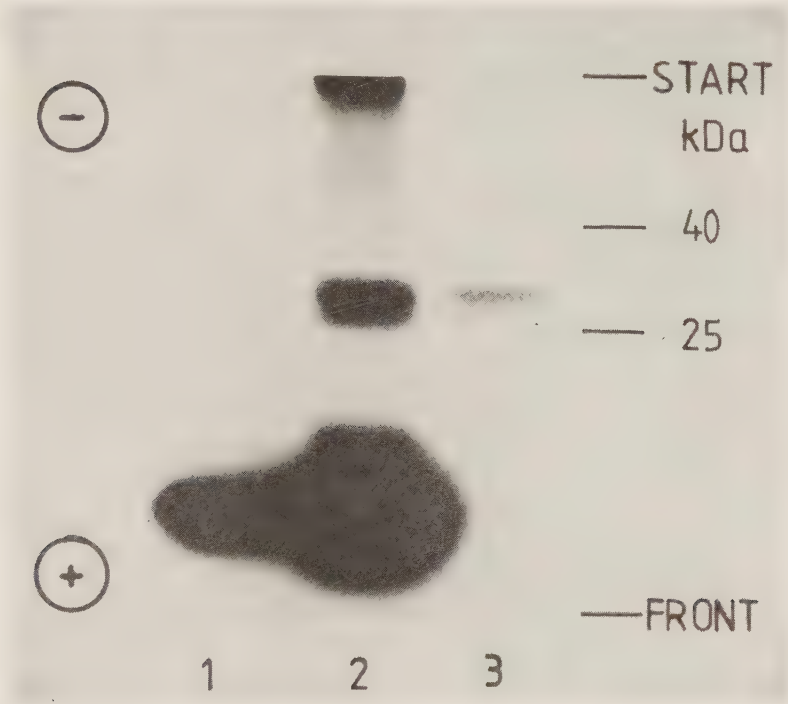
Anschließend wurde der Ansatz mit Puffer I (20 mM Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid pH 7,0) 1:5 verdünnt. Die Waschung mit Puffer I erfolgte bis Fraktion 10, die mit Puffer II (20 mM Glycerophosphat, 1 mM Calciumchlorid, 300 mM NaCl pH 7,0) bis Fraktion 18. Die Elution mit Puffer III (20 mM Glycerophosphat, 10 mM EGTA, 300 mM NaCl pH 7,0) erfolgte von Fraktion 19 bis 26. Anschließend wurde bis Fraktion 34 eine Waschung mit H₂O vorgenommen. Abschließend wurde die restliche Radioaktivität mit 1 % (w/v) SDS eluiert.

Es wurde die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt.

Zusammengefaßt wurden: Pool a: Fraktion 4-7

Pool b: Fraktion 21-24

Abbildung 11: Autoradiogramm der zusammengefaßten Fraktionen nach affinitätschromatographischer Reinigung der Calmodulin-Konjugate mit FP-Sepharose



Die zusammengefaßten Fraktionen aus Abb. 10 wurden TCA-gefällt, das Pellet eines jeden Pools in 0,1 ml Probenpuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen und in der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt (15 % w/v Acrylamid). Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt.

Die vordere Radioaktivitätsbande ist auf das freie ^{125}J -Ubiquitin zurückzuführen.
Das Calmodulin-Konjugat ist bei ca. 29 kDa sichtbar.

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

- Bahn 1 Pool a = Durchlaufpool
- Bahn 2 Ubiquitinierungsansatz (0,1 ml) mit 0,9 mg/ml Calmodulin = Säulenauftrag
- Bahn 3 Pool b = EGTA-Eluat

4.3.3.3.2. Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung

Calmodulin zeigt eine Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Williams et al. (1984). Calmodulin hat hier in Gegenwart von Calcium einen größeren R_f -Wert als bei dessen Abwesenheit (d. h. bei 10 mM EGTA).

Die Coomassie-Färbung des SDS-Gels in Abb. 12 zeigt in den Bahnen 4-6 die Kontrollläufe mit reinem Calmodulin. Dieses stellt sich in Gegenwart von EGTA als eine homogene, mit Coomassie gefärbte Bande von ca. 19,8 kDa dar. Die Doppelbande in Gegenwart von Ca^{2+} weist auf unterschiedliche Bindungszustände des Calmodulins mit Ca^{2+} hin. Dieses Aufspalten in mehrere Banden wurde auch von Williams et al. (1984) berichtet.

Die molekularen Massen im Calcium-System wurden mit ca. 16,5 kDa bzw. 18,5 kDa bestimmt. Clark et al. (1980) geben für Säugercalmodulin im EGTA-System einen Wert von 19 kDa und im Calciumsystem einen von 15,5 kDa an.

Der Vergleich von Ubiquitinierungsansätzen mit Calmodulin (Bahn 2, 3 mit Ca^{2+} , Bahn 1 mit EGTA) zeigt, daß die Bestandteile dieses Ansatzes keinen Einfluß auf die Laufeigenschaften des Calmodulins im System nach Williams haben. Auf dem Autoradiogramm (Abb. 12 B) ist in Gegenwart von EGTA eine Doppelbande (ca. 27,5 kDa und ca. 30 kDa) zu sehen. Die beiden höhermolekularen Konjugate, die in Abb. 8 ebenfalls sichtbar sind, sind unter den gewählten Bedingungen zur Herstellung dieses Autoradiogrammes nicht nachweisbar. Die 30 kDa Bande (1. Ordnung b) wurde als Hauptbande der Doppelbande bezeichnet, da sie mengenmäßig die 27,6 kDa Bande (Nebenbande = 1. Ordnung a) überwog. Die Gegenwart von Calcium bewirkt eine wesentlich geringere Bandenschärfung, was bei reinem Calmodulin in der Coomassie-Färbung (Abb. 12 A) ebenfalls beobachtet werden kann. Auf dem Autoradiogramm (Abb. 12 B) ist eine Haupt-

bande bei ca. 27,7 kDa zu finden, bei der ein deutlicher Übergang in die Hauptbande des Ca^{2+} -freien Laufes sichtbar ist.

Der vordere Rand der unscharfen Ca^{2+} -Bande hat eine molekulare Masse von 25,2 kDa und zeigt einen Übergang in die Nebenbande des EGTA-Systems. Er wurde deshalb als das Äquivalent der Nebenbande im EGTA-System angesehen und als Nebenbande des Calcium-Systems bezeichnet.

Im System nach Williams beträgt die Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung der Hauptbande (30 kDa-Bande im EGTA-System, 27,7 kDa im Calcium-System) ca. 2,3 kDa. Für das Paar - vorderer Rand der Radioaktivitätsbande des Calcium-Systems und Nebenbande des EGTA-Systems - beträgt der Unterschied ebenfalls ca. 2,3 kDa. Damit lagen diese Mobilitätsänderungen durchaus in der Größenordnung des "Calciumsprunges" des reinen Calmodulins von maximal ca. 3,3 kDa. Im EGTA-System betragen die Differenzen der molekularen Massen von reinem Calmodulin und den beiden Konjugatbanden 1. Ordnung 7,7 kDa bzw. 10,2 kDa. Im Ca^{2+} -haltigen System betragen die Differenzen zwischen der Hauptbande des Konjugates 1. Ordnung und den beiden Banden des reinen Calmodulins ca. 9,2 bzw. 11,2 kDa.

Bei längerer Exponierung der Röntgenfilme konnte bei den Konjugaten 2. Ordnung ebenfalls eine Mobilitätsänderung festgestellt werden. Jedoch nahm hierbei die Streustrahlung dermaßen zu, so daß der Laserscanner die dem Auge deutlichen Banden nicht mehr verifizieren konnte. Die deshalb angewandte Methode der Bestimmung mittels Lineal ergab eine geschätzte Änderung der molekularen Masse von ca. 1 kDa.

Das Konjugat 3. Ordnung zeigte keinen Calciumsprung mehr.

Abbildung 12: Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung des Calmodulin-Ubiquitin-Konjugates

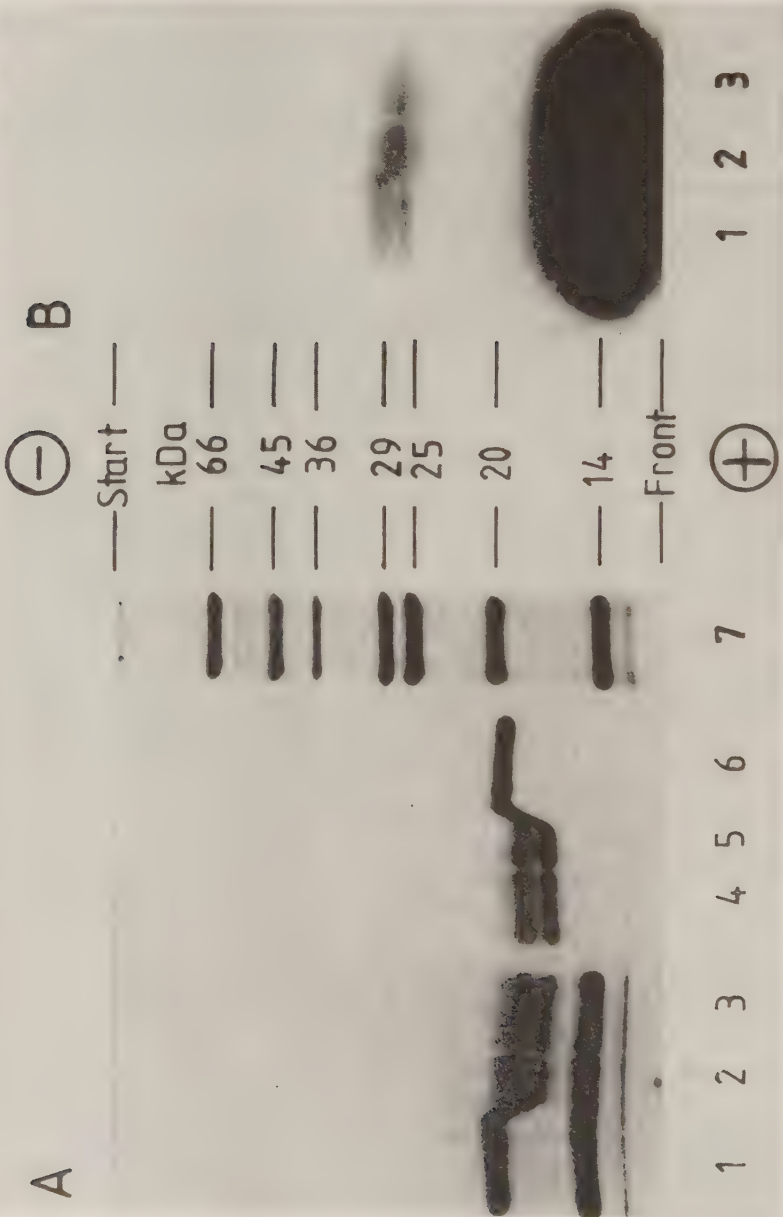


Abbildung 12: Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung des Calmodulin-Ubiquitin-Konjugates

Die Ubiquitinierung wurde nach 3.2.3. ausgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,047 mg/ml Ubiquitin ($8,91 \times 10^6$ cpm/mg), 0,5 mg/ml Calmodulin, 0,1 mM Ca^{2+} und 6,36 mg/ml Reticulozytenlysat. Im Unterschied dazu wurde der Ansatz nach 60 min gekocht (85°C , 3,5 min) und abzentrifugiert ($6000 \times g$, 2 min). Je 0,02 ml Aliquote des Zentrifugationsüberstandes wurden in der SDS-Gelelektrophorese (15 % w/v Acrylamid) nach Williams et al. (1984) (3.2.8.2.) analysiert. Der Probenpuffer mit Calcium enthielt dieses in einer Konzentration von 0,8 mM, der Probenpuffer ohne Calcium enthielt statt dessen 10 mM EGTA. Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt (24 Std Expositionszeit, Entwicklung bei 4°C für 3 min).

Das freie ^{125}J -Ubiquitin läuft im Bereich der Front. Das ^{125}J -Calmodulin-Konjugat ist bei ca. 27 bzw. 29 kDa sichtbar.

A: Coomassie gefärbtes Gel, B: Autoradiogramm

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

- Bahn 1: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin + EGTA im Probenpuffer
- Bahn 2: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin + Ca^{2+} im Probenpuffer
- Bahn 3: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin + Ca^{2+} im Probenpuffer
- Bahn 4: Calmodulin (0,01 mg) + Ca^{2+} im Probenpuffer
- Bahn 5: Calmodulin (0,01 mg) + Ca^{2+} im Probenpuffer
- Bahn 6: Calmodulin (0,01 mg) + EGTA im Probenpuffer
- Bahn 7: Standardproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), G-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa)

4.3.3.4. Aminosäurenanalyse des Calmodulin-Ubiquitin-Konjugates 1. Ordnung

4.3.3.4.1. Reinigung des Konjugates

Für eine Aminosäurenanalyse des Calmodulin-Konjugates war zunächst dessen Reinigung aus dem Inkubationsansatz nötig. Da eine solche noch nie durchgeführt wurde, mußte zunächst eine Reinigungsmethode für das Konjugat entwickelt werden. Dies gestaltete sich äußerst schwierig, da das Konjugat selbst bei Optimierung der Ubiquitinierung nur im Bereich von Picomolen vorlag und es galt, die bei der Reinigung zwangsläufig auftretenden Verluste zu minimieren. Hierbei war das Konjugat ca. 700-fach anzureichern, wobei eine Menge von mindestens 100 Picomolen pro Aminosäurenanalyse notwendig war.

Eine Vielzahl von Proteinspezies konnte zwar mit Hilfe der Affinitätschromatographie mit FP-Sephrose abgetrennt werden, doch war die hiernach noch nötige Abtrennung des nicht ubiquitinierten Calmodulins mit den üblichen Chromatographieverfahren nicht möglich.

Sowohl Gelfiltration auf Sephadex G 75 in Gegenwart von 1 % SDS als auch Ionenaustauschchromatographie über Kationenaustauscher (CM-Cellulose) und Anionenaustauscher (DEAE-Sephacel) erbrachten negative Ergebnisse.

Eine Fällung mit Anti-Ubiquitin-Antikörpern war zwar spezifisch für das Konjugat, erbrachte aber schlechte Ausbeuten.

Aus diesen Schwierigkeiten heraus wurde die Blottmethode, die an sich eine analytische Methode ist, präparativ eingesetzt. Ermöglicht wurde dies durch den Hinweis (Brandt und von Holt, 1986), daß Proteine durch TFA von der Nitrocellulose-Membran eluiert werden können und die TFA die abschließende Aminosäurenanalyse nicht stört, wobei die Autoren keine weiteren Angaben machen.

Zur Herstellung einer ausreichenden Menge des Konjugates wurde zunächst der übliche Ubiquitinierungsansatz nach 3.2.2. in seinem Volumen erhöht (124-fach), wobei die gewählten Konzentrationen an Enzym, ^{125}J -Ubiquitin und Calmodulin nach den Ergebnissen von 4.3.9., 4.3.10. und 4.3.11. so optimiert wurden, daß in diesem Ansatz eine möglichst große Menge an Konjugat gebildet wurde (die Konzentrationen sind in der Legende zu Tab. 8 enthalten).

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde der Ansatz in Aliquote von 0,1 ml aufgeteilt und genau nach 3.2.4.2. zunächst durch einen Hitzeschritt und anschließende Affinitätsadsorption an FP-Sepharose gereinigt.

Das EGTA-Eluat eines jeden Aliquotes wurde danach zur Volumeneinengung getrennt TCA-gefällt, in Laemmli-Probenpuffer (mit 10 mM EGTA) aufgenommen und gelelektrophoretisch bei 12,5 % Acrylamidkonzentration nach 3.2.8.1. aufgetrennt.

Das anschließende Blotten und die Präparation der Konjugate von der Nitrocellulose-Membran erfolgten nach 3.1.9. bzw. 3.1.10. Hierbei konnten der nötige Waschschriff der Membran und die TFA-Elution so optimiert werden, daß beide Schritte eine Ausbeute von ca. 75 % erbrachten (siehe Tab. 8). Die anschließende TCA-Fällung erwies sich als wichtiger Schritt, um noch verbleibende Verunreinigungen (Membranbestandteile) abzutrennen.

In Abbildung 13 (A=Coomassie-Färbung, B=Autoradiogramm) ist die Reinigung des Ubiquitin-Calmodulin-Konjugates aus dem Inkubationsansatz bis zum Endprodukt für die Aminosäurenanalyse gezeigt. Da einerseits die Proteinkonzentration der verschiedenen Reinigungsschritte für die aufgetragene Menge limitierend war, andererseits die Reinigung so aussagekräftig wie möglich dargestellt werden sollte, entsprechen die aufgetragenen Mengen einander nicht. Die aufgetragenen Mengen sind der Legende zu entnehmen.

In der Coomassie-Färbung des Gels (Abb. 13 A) wird die schwache Anfärbbarkeit des TFA-Eluates (Bahn 2) deutlich. Das Calmodulin-Konjugat ist als schwache Bande mit ca. 31,5 kDa sichtbar, was mit dem Ergebnis aus dem Autoradiogramm korreliert.

Eine Proteinbande in Höhe des Calmodulins ist im TFA-Eluat (Bahn 2) nicht sichtbar (vergleiche Bahn 3).

Die in der Coomassie-Färbung sichtbare niedermolekulare Bande des TFA-Eluates (Bahn 2) konnte nicht identifiziert werden. Ihr entsprach keine Radioaktivitätsbande. Die Proteolysebanden, die auf dem Autoradiogramm des TFA-Eluates (Bahn 2) sichtbar sind, sind wegen ihrer geringen Menge in der Coomassie-Färbung (Bahn 2) nicht nachweisbar.

Auf dem Autoradiogramm (Abb. 13 B) wird sichtbar, daß das TFA eluierte Konjugat (Bahn 2) in der SDS-Gelelektrophorese in Gegenwart von EGTA eine höhere molekulare Masse (31,6 kDa) zeigt, als zu erwarten war. Die niedermolekularen Banden des TFA-Eluates zeigen an, daß ein Teil der Peptidketten gespalten wurde. Dies könnte auf die TFA zurückzuführen sein, wofür auch die Zerstörung des Tyrosins spricht (siehe Tab. 9 und 10).

Aus Tabelle 8 sind die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte ersichtlich.

Als verlustreichster Schritt erwies sich das Blotten des Konjugates auf die Nitrocellulose-Membran mit ca. 36 % Ausbeute. Von dieser geblotteten Radioaktivität wurden durch Waschungen und Elution weitere 44 % verloren, so daß als Endausbeute ca. 20 % des EGTA-Eluates verblieben. Die Bestimmung der Anreicherung war nicht möglich, da die hierfür notwendigen Untersuchungen eine zu große Menge an Konjugat erfordert hätten und mit der verbleibenden Restmenge keine Aminosäurenanalyse mehr möglich gewesen wäre.

Abbildung 13: Reinigung des Calmodulin-Konjugates

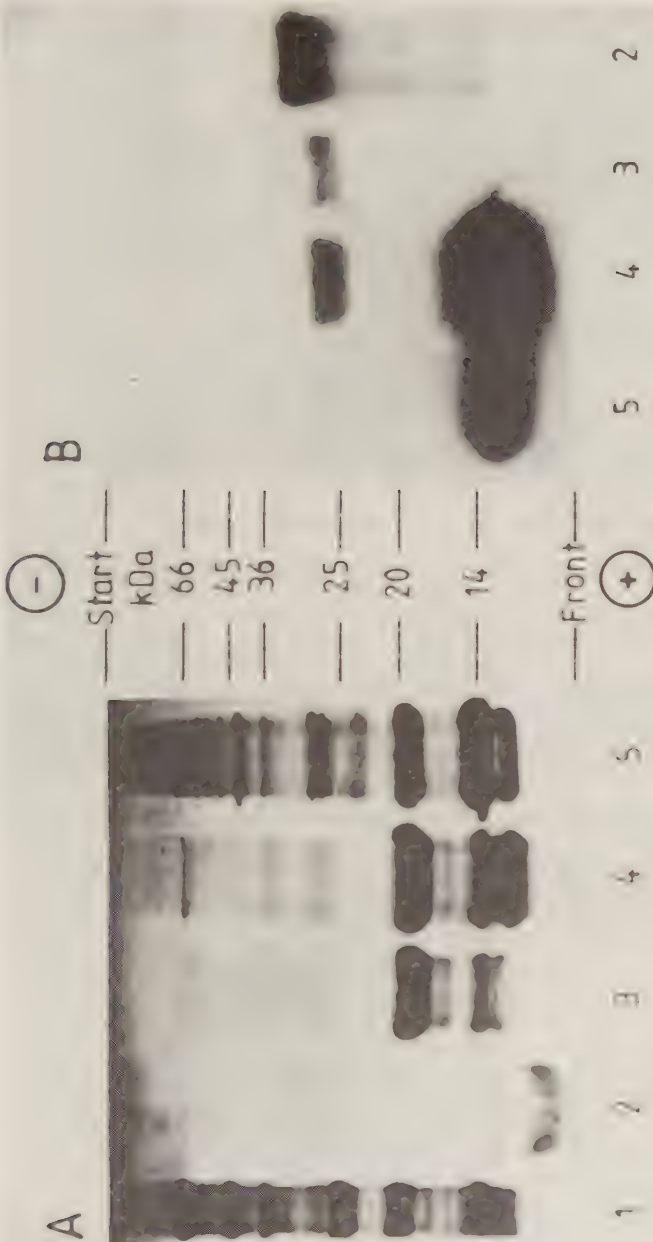


Abbildung 13: Reinigung des Calmodulin-Konjugates aus dem Ubiquitinierungsansatz für die Aminosäuren-analyse

Die Konjugation von ^{125}J -Ubiquitin ($5,3 \cdot 10^7$ cpm/mg) an Calmodulin und die Reinigung der Konjugate 1. Ordnung erfolgte nach 4.3.3.4.1.. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 12,4 ml. Aliquote der Reinigungsschritte wurden in der SDS-Gelelektrophorese (15 % w/v Acrylamid) nach Laemmli (1970) aufgetrennt (3.2.8.1.). Der Probenpuffer enthielt zusätzlich 10 mM EGTA. Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt (24 Std. Expositionszeit, Entwicklung bei Raumtemperatur).

Die Angaben in den Klammern geben an, wieviel Prozent des Gesamtproteins eines jeden Reinigungsschrittes aufgetragen wurde.

Calmodulin ist in der Coomassie-Färbung bei ca. 20 kDa sichtbar (Bahn 3-5). Das ^{125}J -Calmodulin-Konjugat hat eine molekulare Masse von ca. 29 bzw. 31 kDa. Die vordere Radioaktivitätsbande ist auf das freie ^{125}J -Ubiquitin zurückzuführen.

A: Coomassie gefärbtes Gel, B: Autoradiogramm

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

- Bahn 1: Standardproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), G-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa)
- Bahn 2: Ubiquitinierungsansatz nach Blotten und TFA-Elution (15 %)
- Bahn 3: Ubiquitinierungsansatz nach FP-Sepharose (0,8 %)
- Bahn 4: Ubiquitinierungsansatz nach dem Kochen (0,65 %)
- Bahn 5: Ubiquitinierungsansatz vor dem Kochen (0,2 %)

Tabelle 8: Reinigungstabelle des Calmodulin-Konjugates für die Aminosäurenanalyse

Schritt	cpm gesamt	pMole uCam	Ausbeute % gesamt	pro Schritt
EGTA-Eluat	2858264	6936	100	100
TCA-Fällung	2831897	6872	99	99
NC-Membran	1026076	2490	35.9	36.2
Waschschritt	789052	1914	27.6	76.9
TFA-Eluat	580636	1409	20.3	73.6

Der Inkubationsansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0,1 mM CaCl₂, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 1 mg/ml Calmodulin (sulfolanbehandelt), 6,4 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,17 mg/ml ¹²⁵J-Ubiquitin (48,2*10⁶ cpm/mg). Das gesamte Ansatzvolumen betrug 12,4 ml. Zur Durchführung der Reinigung siehe 4.3.3.4.1. Es wurden 88 pMol uCam pro mg Lysatprotein gebildet. Dies entsprach einer spezifischen Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität von 1440 nUnits/mg Lysatprotein.

4.3.3.4.2. Aminosäurenanalyse eines Kontrollproteines

In der Literatur fand sich lediglich der Hinweis, daß Proteine mit TFA von der Nitrocellulose-Membran eluiert werden könnten und dieses TFA die Aminosäurenanalyse nicht stören solle (Brandt und von Holt, 1986). Es war jedoch nicht auszuschließen, daß die gewählte Isolationsmethode die anschließende Aminosäurenanalyse stören könnte. Aus diesem Grunde wurde zunächst die Analyse eines Kontrollproteins durchgeführt.

In Tabelle 10 ist der Analyse von geblottetem und TFA eluiertem Calmodulin (Spalte 1) zu entnehmen, daß die entwickelte Isolationsmethode tauglich ist für die nachfolgende Aminosäurenanalyse.

Es ergeben sich lediglich Abweichungen bei Tyrosin, das bei keiner Hydrolysezeit mehr nachweisbar ist, bei Methionin und Trimethyllysin, die beide ca. 20 % erniedrigt sind, und Glycin, dessen Erhöhung durch den glycinhaltigen Puffer des Laemmli-Systems bedingt ist.

4.3.3.4.3. Aminosäurenanalyse des Calmodulin-Konjugates

Bei der Aminosäurenanalyse des Konjugates zeigte sich, daß dieses erst nach 72 Stunden vollständig hydrolysiert war, deshalb wurden nur diese Werte in den Tabellen übernommen. Tabelle 9 enthält die tatsächlich gemessenen Picomole/0,1 ml, während in Tabelle 10 diese Werte auf ein Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat im molaren Verhältnis von 1:1 umgerechnet wurden.

Die Analyse des Konjugates wurde in 2 getrennten Präparationen durchgeführt. Die erste Präparation (Tab. 10, Spalte 3) lieferte eine schlechte Übereinstimmung mit den berechneten Werten (Tab. 10, Spalte 6).

Deshalb wurde das System dahingehend verbessert, daß mit

Hilfe eines Kontrollansatzes ohne CaM die endogenen Proteine berücksichtigt werden konnten (Tab 9, Spalte 3), die im Laemmli-System die gleichen Laufeigenschaften zeigen wie das Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat. Das Volumen der Ansätze mit und ohne Calmodulin war hierbei gleich groß und beide Ansätze wurden unter identischen Bedingungen weiter bearbeitet.

In Anbetracht der geringen Menge, die für die Analyse der Konjugate zur Verfügung stand (70-150 pMole), ergeben sich für die 1. und 2. Konjugatpräparation (Tab 10, Spalte 3,4) eine gute Übereinstimmung.

In Spalte 5 (Tab. 10) wurden die in dem Kontrollansatz ohne Calmodulin ermittelten Werte (Tab 9, Spalte 3) der einzelnen Aminosäuren von den Werten der 2. Konjugatpräparation (Tab 9, Spalte 2) subtrahiert.

Sie zeigen zwar eine bessere Übereinstimmung mit den erwarteten Werten als die unkorrigierten, und somit einen Fortschritt, doch ist selbst unter der Berücksichtigung der Methodenfehler - erniedrigtes Tyrosin, Methionin, Trimethyl-lysin, erhöhtes Glycin - insgesamt eine schlechte Übereinstimmung gegeben.

Gute Übereinstimmungen ergaben sich für ASX, GLX, Serin, Trimethyllysin, Arginin, Phenylalanin und Leucin.

Die Menge des in der Aminosäurenanalyse bestimmten Trimethyllysins entsprach 80 % der Menge, die nach der Bestimmung des radioaktiven Ubiquitinanteils, unter der Zugrundelegung eines Konjugates mit einem molaren Verhältnis von 1:1, erwartet wurde.

Für ein solches Konjugat ergeben die Werte der korrigierten Aminosäurenanalyse (Ansatz mit Calmodulin minus Ansatz ohne Calmodulin, Tab 10, Spalte V) einen Gehalt von 0,66 Mol Trimethyllysin pro Mol Konjugat.

Abb. 14 zeigt das Chromatogramm der 2. Präparation, wobei der Aminosäuregehalt der Kontrolle graphisch subtrahiert wurde.

Tabelle 9: Aminosäurenanalyse von geblotteten und TFA
eluierten ^{125}J -Ubiquitin-Calmodulin-
Konjugaten und der Kontrolle
(Angaben in pMol/0,1ml)

Amino- säuren	I	II	III	IV
ASX	1343	6193	1574	4619
GLX	1672	8192	1868	6324
Serin	528	2928	1506	1422
Glycin	1408	7578	3274	4304
Threonin	662	3107	780	2327
Histidin	221	1055	419	636
Alanin	899	4653	1851	2802
TM-Lysin	42	110	0	110
Arginin	422	2319	716	1603
Tyrosin	0	94	0	93
Methionin	260	1115	202	913
Valin	734	3606	1309	2297
Phenylalanin	402	2413	704	1709
Isoleucin	603	2847	833	2014
Leucin	922	5104	2038	3066
Lysin	568	3126	1661	1465
Prolin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cystein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tryptophan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Zur Durchführung der Aminosäurenanalyse siehe 3.2.11.

"n.d.": keine Bestimmung durchgeführt.

"ASX" : Asparagin und Asparaginsäure.

"GLX" : Glutamin und Glutaminsäure.

I : 1. Konjugatpräparation

II : 2. Konjugatpräparation

III: Kontrollansatz ohne Calmodulin, der wie II behandelt wurde

IV : die Werte von II minus den Werten von III.

Die Volumina des Inkubationsansatzes für II und III waren gleich groß.

Tabelle 10: Aminosäurenanalyse von geblotteten und TFA
eluierten Proteinen
(Angaben in Mole Aminosäuren/Mol Protein)

Amino- säuren	Calmodulin		¹²⁵ I-Ubiquitin-Calmodulin-Konjugat			
	I	II	III	IV	V	VI
ASX	22.1	23	27.51	24.9	28.3	30
GLX	26.9	27	34.25	33	38.8	39
Serin	3.67	4	10.79	11.77	8.76	7
Glycin	12.85	11	28.84	30.48	26.41	17
Threonin	10,99	12	13.56	12.49	14.27	19
Histidin	0.95	1	4.52	4.24	3.9	2
Alanin	10,98	11	18.41	18.71	17.2	13
TM-Lysin	0.80	1	0.47	0.44	0.66	1
Arginin	5.79	6	8.64	9.32	9.83	10
Tyrosin	0	2	0	0.37	0.57	3
Methionin	7.06	9	5.32	4,5	5,6	10
Valin	7.05	7	15.03	14,50	14,08	11
Phenylalanin	7.23	8	8.23	9.70	10.23	10
Isoleucin	8.35	8	12.35	11.45	12.35	15
Leucin	9.06	9	18.88	20.05	18.98	18
Lysin	6.99	7	11.63	12.57	8.96	14
Prolin	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.	5
Cystein	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0
Tryptophan	n.d.	0	n.d.	n.d.	n.d.	0

Zur Durchführung der Aminosäurenanalyse siehe 3.2.11.

"n.d.": keine Bestimmung durchgeführt.

"ASX" : Asparagin und Asparaginsäure.

"GLX" : Glutamin und Glutaminsäure.

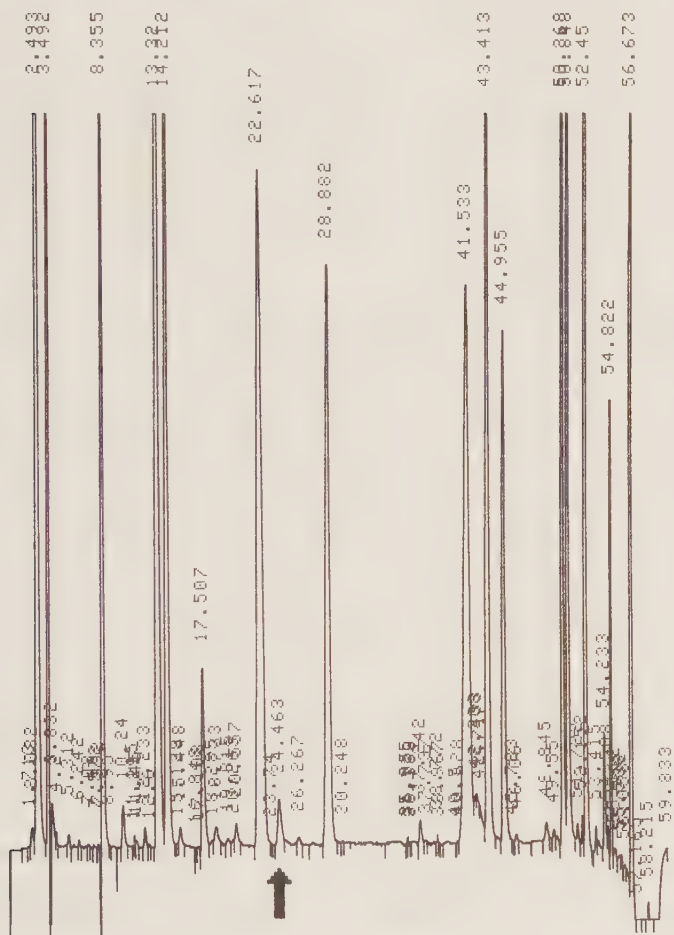
I: geblottetes und TFA-eluiertes Calmodulin aus Rinderhoden. Die Berechnung erfolgte unter der Berücksichtigung des nicht bestimmten Prolins mit 146 Aminosäuren pro Calmodulinmolekül (Mittelwert aus je einer Probe zu den Hydrolysezeiten 24, 48 und 72 Std.).

II: Werte nach der Sequenzanalyse von Hirncalmodulin (Watterson et al., 1980)

- III: Aminosäurenanalyse der 1. Präparation (72 Std. Hydrolyse, eine Probe)
- IV: Aminosäurenanalyse der 2. Präparation (72 Std. Hydrolyse, eine Probe)
- V: Differenz zwischen den Werten der 2. Präparation (Tab. 10, Spalte IV; Tab. 9, Spalte II)) und den Werten des Kontrollansatzes ohne Calmodulin (Tab. 9, Spalte III), der ebenfalls geblottet und TFA-eluiert wurde.
- VI: Theoretische Aminosäurezusammensetzung eines Ubiquitin-Calmodulin-Konjugates im molaren Verhältnis von 1:1, berechnet nach der Sequenzanalyse von humanem Ubiquitin (Özkaynak et al., 1984) und Hirncalmodulin (Watterson et al., 1980).

Die Berechnung des Calmodulin-Konjugates erfolgte unter der Berücksichtigung des nicht bestimmten Prolins mit 219 Aminosäuren pro Konjugatmolekül.

Abbildung 14: Analyse des Konjugates nach Abzug der Kontrolle



Die Aminosäurenanalyse wurde nach 3.2.11. ausgeführt. Der Aminosäuregehalt des Kontrollansatzes (Tab. 9, Spalte III) wurde von dem des Konjugates (Tab. 9, Spalte II) subtrahiert. Die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte aufgrund ihrer Retentionszeiten (Retentionszeiten nach Eichkurve vom 19.5.88).

ASX= 2,5 min, GLX= 3,5 min, Serin= 8,3 min, Glycin= 13,3 min, Threonin= 14,2 min, Histidin= 17,5 min, Alanin= 22,6 min, Trimethyllysin 24,5 min, Arginin= 28,8 min, Tyrosin= 37,2 min, Valin= 43,5 min, Methionin= 44,9 min, Phenylalanin= 50,4 min, Isoleucin= 50,9 min, Leucin= 52,4 min, Lysin= 56,7 min (vergl. Abb. 2a+b). Der Pfeil zeigt den

4.3.4. Meßverfahren (FP-Test) zur Ubiquitinierung von Calmodulin (CaM)

Auf den Ergebnissen aus 4.3.3.3.1. fußend wurde ein Test zur Messung der Ubiquitinierung von CaM mit Hilfe eines Batchverfahrens und des Einsatzes von ^{125}J -Ubiquitin aufgebaut. Zur Durchführung dieses Testes siehe 3.2.4.2. Abbildung 15 zeigt das SDS-Gel (Abb. A = Coomassie-Färbung; Abb. B = Autoradiogramm) der TCA-gefällten Überstände, die in Tab. 11 aufgelistet sind.

Das Autoradiogramm (Abb. B) zeigt, daß im EGTA-Eluat des Ubiquitinierungsansatzes mit CaM (Bahn 5) nur eine Radioaktivitätsbande mit ca. 29 kDa sichtbar ist. Diese Bande findet keine Entsprechung im EGTA-Eluat des Ansatzes minus CaM (Bahn 8). Die 29 kDa-Bande entsteht durch das Verschmelzen der beiden Calmodulin-Konjugate 1. Ordnung.

Polyubiquitinierte Calmoduline sind aufgrund der relativ kurzen Expositionszeit des Röntgenfilmes nicht sichtbar. In der Coomassie-Färbung zeigt das EGTA-ELuat des Ansatzes mit CaM (Bahn 5) eine homogene Calmodulinbande (vergleiche Kontrollcalmodulin Bahn 1), die im EGTA-Eluat der Kontrolle (Bahn 8) fehlt.

Tabelle 11 belegt, daß sich diese im Autoradiogramm gezeigten Unterschiede der EGTA-Eluate mittels Gamma-Zählung messen lassen.

Das Signal-Rausch-Verhältnis erreicht seinen höchsten Wert im EGTA-Eluat. Die hier im Ansatz mit CaM vorgefundene Radioaktivität ist um den Faktor 7 höher als im Kontrollansatz.

Die hohe Radioaktivität der Waschschriffe ist auf die Abtrennung des freien ^{125}J -Ubiquitins zurückzuführen (vergl. Abb. B, Bahn 3,4,6,7). Aus diesem Grunde sind die Radioaktivitäten der einzelnen Waschschriffe in den Ansätzen mit und ohne Calmodulin ungefähr gleich groß.

Da im Autoradiogramm (Abb. 15 B) gezeigt wurde, daß die Radioaktivität des EGTA-Eluates des Ansatzes mit CaM (Bahn 5) ausschließlich von Ubiquitin-Calmodulin-Konjugaten herührt, kann der mittels Gamma-Zählung ermittelte Unterschied in den EGTA-Eluaten der Ansätze mit und ohne CaM als spezifisch für die Ubiquitinierung von CaM betrachtet werden.

Die Radioaktivität im EGTA-Eluat des Ansatzes ohne CaM mußte als unspezifisch betrachtet werden, zumal sie stets etwa gleich groß war wie die Radioaktivität der EGTA-Eluate von Ansätzen ohne ATP. Ebenso ist die nach der Elution mit EGTA an der FP-Sephrose verbleibende Radioaktivität unspezifisch, da sie in den Ansätzen mit und ohne CaM gleich groß ist.

Zur Berechnung der Ubiquitinierung wurde die unspezifische Radioaktivität der Ansätze ohne Calmodulin (Calmodulin-abhängige Ubiquitinierung), oder die der Ansätze ohne ATP/ Mg^{2+} (ATP-abhängige Ubiquitinierung) von der Radioaktivität der Ansätze mit Calmodulin subtrahiert.

Die Verluste an Calmodulin-Konjugaten beim Kochschritt konnten nur indirekt durch den Verlust an ^{125}J -Ubiquitin bestimmt werden. Sie betrugen in 3 Parallelversuchen ca. 10 %. Die Verluste an Calmodulin-Konjugaten im Verlauf der Reinigung, durch Ausschneiden der Radioaktivitätsbanden und Zählen im Gamma-Zähler gemessen, betrugen 11 % bei der 1. Waschung bzw 15 % bei der zweiten. Somit beträgt die Gesamtausbeute des FP-Testes an Calmodulin-Konjugaten ca. 70 %.

In Tabelle 12 wurden die Ubiquitinierung von Calmodulin mit der autoradiographischen Methode und dem FP-Test bestimmt. Beide Methoden erbrachten weitgehend identische Werte.

Abbildung 15: Dokumentation des FP-Testes

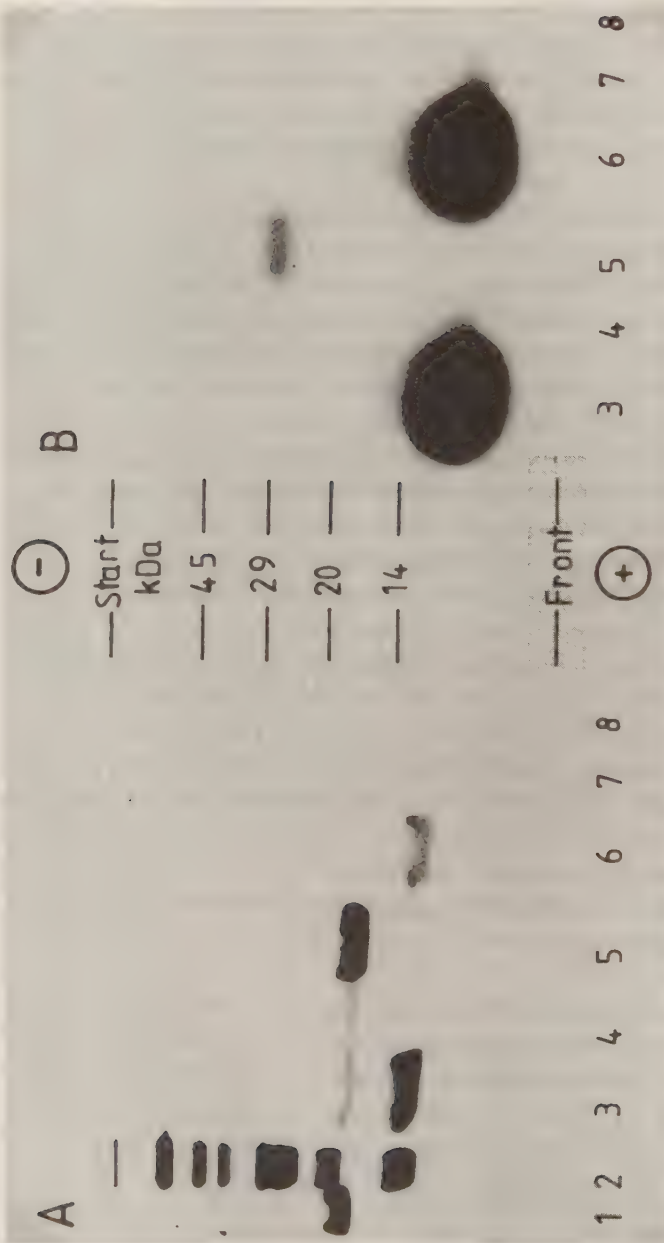


Abbildung 15: Dokumentation des FP-Testes

Die Überstände aus Tab. 11 wurden TCA-gefällt, in 0,1 ml Probenpuffer aufgenommen und SDS-gelelektrophoretisch nach 3.2.8.1 aufgetrennt (15 % w/v Acrylamid).

Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt (24 Std. Expositionszeit, Entwicklung bei 4° für 3 min).

Das ^{125}J -Calmodulin-Konjugat ist bei ca. 29 kDa auf dem Autoradiogramm sichtbar. Die vordere Radioaktivitätsbande repräsentiert das freie ^{125}J -Ubiquitin.

A: Coomassie gefärbtes Gel, B: Autoradiogramm

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

Bahn 1: Calmodulin 0,01 mg

Bahn 2: Standardproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), G-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa)

Bahn 3-5 Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin

Bahn 3: Waschpuffer I

Bahn 4: Waschpuffer II

Bahn 5: EGTA-Eluat

Bahn 6-8 Ubiquitinierungsansatz ohne Calmodulin

Bahn 6: Waschpuffer I

Bahn 7: Waschpuffer II

Bahn 8: EGTA-Eluat

Tabelle 11: Dokumentation des FP-Testes

RADIOAKTIVITÄT in CPM				
	+Calmodulin		-Calmodulin	
	FP-Sephar.	Über- stände	FP-Sephar.	Über- stände
Kochüberstand	—	757158	—	712450
Waschpuffer I	—	654932	—	648374
FP-Sepharose nach Wasch I	102226	—	64076	—
Waschpuffer II	—	63276	—	55090
FP-Sepharose nach Wasch II	38950	—	8986	—
EGTA-Eluat	—	33028	—	4550
FP-Sepharose nach Elution	5922	—	4436	—

Der Inkubationsansatz enthielt in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 1,1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 0,5 mg/ml Calmodulin, 6,4 mg/ml Reticulozyten-lysat und 0,043 mg/ml ¹²⁵J-Ubiquitin (1,98*10⁸ cpm/mg).

Im Ansatz -Calmodulin wurde dieses Protein nicht zugesetzt. Zur Durchführung des Testes siehe 3.2.4.2.

Das EGTA-Eluat umfaßt die gesamten 2 ml der Elution. Im Waschpuffer II wurden die beiden Überstände der Waschung mit diesem Puffer zusammengefaßt.

Tabelle 12: Vergleich der autoradiographischen Methode und des FP-Testes

Methode	cpm	Konjugat pMol/0,1 ml
autoradiogr.	44816	18,5
FP-Test	46592	19,3

Die autoradiographische Bestimmung (siehe 3.2.8.1.) erfolgte nach der Auftrennung von 0,03 ml eines Inkubationsansatzes (siehe 3.2.3.) mit Calmodulin (0,5 mg/ml) in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (15 %) nach Laemmli (1970). Die ermittelten Werte wurden auf 0,1 ml umgerechnet. Es wurden die Konjugate 1.-3. Ordnung berücksichtigt.

Der FP-Test wurde mit einem Aliquot (0,1 ml) desselben Inkubationsansatzes ausgeführt, der auch für die autoradiographische Methode benutzt wurde.

Im FP-Test wurde die Calmodulin-abhängige Ubiquitinierung (Def.: 3.2.4.3.) gemessen.

4.3.5. Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins von der Ca^{2+} -Konzentration

Wie in Tabelle 13 gezeigt, ist die Ubiquitinierung von Calmodulin stark Ca^{2+} -abhängig.

Bei ca. 10 nM Ca^{2+} (bzw. 1 mM EGTA) Endkonzentration kommt die Ubiquitinierung von Calmodulin fast vollständig zum Erliegen. Bei ca. 2 μM Ca^{2+} -Endkonzentration steigt die Ubiquitinierung auf das ca. 6-fache des weitgehend Calcium-freien Systems.

Bei 0,1 mM Ca^{2+} , der sonst benutzten Standardkonzentration für Ubiquitinierungsansätze, war die Ubiquitinierungsrate ca. 4-fach höher als bei 2 μM Ca^{2+} .

Die freie Calciumkonzentration in der Gegenwart von EGTA wurde nach der Bindungskonstante von EGTA für Ca^{2+} von $K_a = 4,27 \cdot 10^{-9}$ bei pH 8,0 (Bjerrum et al., 1957), unter der Annahme eines 1:1-Komplexes zwischen EGTA und Ca^{2+} , berechnet.

Um störende EGTA-Effekte auf das ubiquitinierende System auszuschließen, wurden oxidierte RNase und Lysozym ebenfalls in Ca^{2+} -freien (= 1 mM EGTA) und Ca^{2+} -haltigen (= 0,1 mM Ca^{2+}) Ubiquitinierungsansätzen getestet. Das SDS-Gel (Abb. A = Coomassie-Färbung; Abb. B = Autoradiogramm) dieses Kontrollversuches wird in Abbildung 16 gezeigt. Die gleichmäßige Schwärzung des Röntgenfilmes (Abb. 16 B) in allen Ansätzen, ob mit oder ohne Calcium, beweist, daß das ubiquitinierende System nicht Ca^{2+} -abhängig ist. Des weiteren wird gezeigt, daß die Schwärzung der RNase- (Bahn 4,5) bzw. Lysozym-Konjugatbanden (Bahn 7,8; vergl. Kontrolle ohne Substrat Bahn 10) in den Ansätzen mit und ohne Calcium gleich stark sind. Diese Proteine werden nicht Ca^{2+} -abhängig ubiquitiniert.

Der Vergleich der Ansätze mit Calmodulin als Substrat zeigt, daß im Calcium-freien Ansatz (Bahn 3) bei den drei

Tabelle 13: Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins von der Calciumkonzentration

freie Calcium-konz.	Netto cpm	spez. Akt. (nUnits/mg)	% Ubiquitinierung
10 nM	788	6	3.9
2 µM	4814	37	23.8
100 µM	20206	156	100

Die Bestimmung erfolgte mit dem FP-Test (3.2.4.2.).

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 0,11 mg/ml Calmodulin, 5,3 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,051 mg/ml ¹²⁵J-Ubiquitin (3,97*10⁶ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Ebenso enthielten die Ansätze noch folgende Endkonzentrationen von EGTA und Ca²⁺.

Der Ansatz mit 10 nM Ca²⁺ enthielt zusätzlich 1 mM EGTA.

Der Ansatz mit 2 µM Ca²⁺ enthielt 1 mM Ca²⁺ und 1 mM EGTA.

Im Ansatz mit 100 µM Ca²⁺ wurden 1,1 mM Ca²⁺ und 1 mM EGTA zugesetzt.

Die freie Calciumkonzentration in Gegenwart von EGTA wurde nach der Bindungskonstanten des EGTA für Ca²⁺ von K_a = 4,27*10⁻⁹ bei pH 8,0 berechnet.

Zur Definition der Ubiquitinierungs-Unit siehe 3.2.4.3..

Abbildung 16: Ca^{2+} -abhängige Ubiquitinierung des Calmodulins (Legende umseitig)

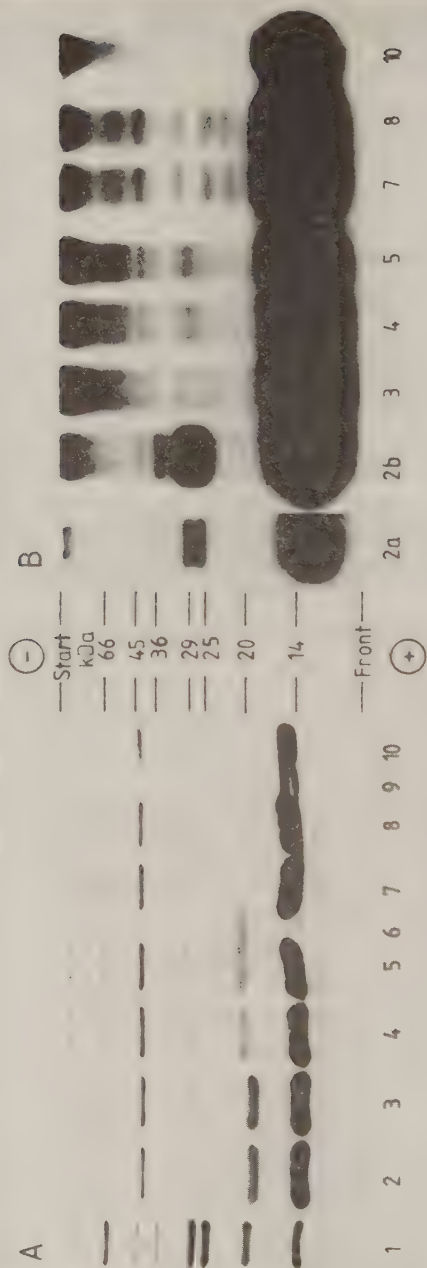


Abbildung 16: Ca^{2+} -abhängige Ubiquitinierung des Calmodulins

Die Ubiquitinierung der Substratproteine wurde nach 3.2.3. ausgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten 0,047 mg/ml Ubiquitin ($2,73 \cdot 10^6$ cpm/mg), 6,36 mg/ml Lysat und von den Substraten 0,5 mg/ml Calmodulin bzw. 0,5 mg/ml ox. RNase oder 0,5 mg/ml Lysozym. Zur Überprüfung der Calciumabhängigkeit enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich 0,1 mM Ca^{2+} (Ansätze mit Calcium) oder 1 mM EGTA (Ansätze ohne Calcium). 0,03 ml der Reaktionsansätze wurden zum Reaktionsstop mit 0,07 ml Probenpuffer nach Laemmli, der 10 mM EGTA enthielt, gemischt und für 5 min erhitzt. Die Ubiquitinierungsansätze wurden anschließend in der SDS-Gelelektrophorese (15 % w/v Acrylamid) nach 3.2.8.1. analysiert. Die Autoradiogramme wurden nach 3.2.9. angefertigt (48 Std. Expositionszeit, Entwicklung siehe unten).

Die vordere Radioaktivitätsbande entsteht durch das freie ^{125}J -Ubiquitin.

A: Coomassie gefärbtes Gel, B: Autoradiogramm
Bahn 2b-10 bei Raumtemperatur entwickelt

Die Symbole in den Kreisen geben die Lage der Kathode und der Anode an.

- Bahn 1: Standardproteine BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), G-P-Dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (25 kDa), Trypsininhibitor (20,1 kDa), Lactalbumin (14,2 kDa)
- Bahn 2: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin + Ca^{2+} im Reaktionsansatz
Bahn 2a: Autoradiogramm bei 4 ° C für 3 min entwickelt
Bahn 2b: Autoradiogramm bei Raumtemperatur entwickelt
- Bahn 3: Ubiquitinierungsansatz + Calmodulin + EGTA im Reaktionsansatz
- Bahn 4: Ubiquitinierungsansatz + ox. RNase + Ca^{2+} im Reaktionsansatz
- Bahn 5: Ubiquitinierungsansatz + ox. RNase + EGTA im Reaktionsansatz
- Bahn 6: ox. RNase 0,01 mg
- Bahn 7: Ubiquitinierungsansatz + Lysozym + Ca^{2+} im Reaktionsansatz
- Bahn 8: Ubiquitinierungsansatz + Lysozym + EGTA im Reaktionsansatz
- Bahn 9: Lysozym 0,01 mg
- Bahn 10: Ubiquitinierungsansatz + ohne exogenes Substrat + Ca^{2+} im Reaktionsansatz

sichtbaren Calmodulinkonjugaten eine wesentlich schwächere Schwärzung als im Ansatz mit Calcium (Bahn 2) zu finden ist.

Das heißt, daß die Ubiquitinierung nicht selektiv für ein bestimmtes Konjugat Ca^{2+} -abhängig ist, sondern daß alle Konjugate betroffen sind.

4.3.6. Einfluß des Bindungszustandes des Calmodulins auf die Ubiquitinierung

Im weitgehend Calcium-freien Zustand der Zelle kommt Calmodulin als freies Calmodulin und als integral gebundene Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase vor. Erhöht sich die Calciumkonzentration so wird das freie Calmodulin Calcium-abhängig an eine Vielzahl von Enzymen gebunden (=peripher gebundenes Calmodulin), was zu deren Aktivierungssteigerung führt (Cheung, 1980).

Es war deshalb interessant, die Ubiquitinierung der verschiedenen Bindungszustände zu untersuchen.

In Tabelle 14 sind die unterschiedlichen Ubiquitinierungsraten aufgelistet. Als 100 % wurde die Ubiquitinierung des freien, ungebundenen Calmodulins gesetzt.

Es zeigte sich, daß das integral gebundene Calmodulin der Phosphorylase Kinase (=Delta-Untereinheit) nicht ubiquitiniert werden kann, im Gegensatz zur liberalisierten Delta-Untereinheit.

Da die eingesetzte Delta-Untereinheit auf die gleiche Art und Weise präpariert wurde, wie sie dem Kochschritt des FP-Testes entspricht, konnte eine Artefaktbildung durch den FP-Test ausgeschlossen werden.

Als Modellsystem für das Ca^{2+} -abhängig gebundene Calmodulin wurde das Phosphorylase Kinase - Calmodulin - System benutzt. Die Phosphorylase Kinase besitzt das integral gebundene Calmodulin (=Delta-Untereinheit) und bindet in Gegenwart von Calcium pro Mol zusätzlich ein Mol Calmodulin (Shenolikar et al., 1979) (=peripher gebundenes

Tabelle 14: Einfluß verschiedener Bindungszustände des Calmodulins auf die Ubiquitinierung

Protein	Netto cpm	spez. Akt. nUnits/mg Lysatprotein	% Ubiquiti- nierung
CaM	20206	156	100
Kinase	0	0	0
Kinase + CaM	284	2.2	1.4
Delta	10416	80	51.5

Die Ubiquitinierung wurde mittels FP-Testes (siehe 3.2.4.2.) bestimmt. Es ist die Calmodulin-abhängige Ubiquitinierung (3.2.4.3.) angegeben.

Die Angaben der spezifischen Aktivitäten beziehen sich auf die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität (Def. 3.2.4.3.).

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 1,1 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, 5,3 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,051 mg/ml ¹²⁵J-Ubiquitin (3,97*10⁸ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Ebenso enthielten die Ansätze noch folgende

Endkonzentrationen:

"CaM": 0,11 mg/ml Calmodulin.

"Kinase": 2,52 mg/ml Phosphorylase Kinase. Der Ansatz enthielt somit 0,125 mg/ml der Delta-Untereinheit (=integral gebundenes Calmodulin)

"Kinase + CaM": 2,52 mg/ml Phosphorylase Kinase und 0,11 mg/ml Calmodulin, entsprechend eines molaren Verhältnisses von 1:0,9. Unter den gewählten Bedingungen ist praktisch das gesamte Calmodulin Calcium-abhängig an die Phosphorylase Kinase gebunden (=peripher gebundenes Calmodulin)

"Delta": 0,11 mg/ml der Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase. Die Untereinheit wurde jedoch zuvor aus der Phosphorylase Kinase isoliert (zur Präparation siehe 3.1.4.3.).

Calmodulin).

Da der Versuch diese Stöchiometrie berücksichtigte und somit kein freies Calmodulin mehr vorhanden war, und gleichzeitig die Delta-Untereinheit (=integral gebundenes Calmodulin) nicht ubiquitinierbar ist, mußte jede gemessene Ubiquitinierung vom Calcium-abhängig gebundenen Calmodulin (=peripher gebundenes Calmodulin) stammen.

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, ist die Ubiquitinierung des Ca^{2+} -abhängig gebundenen Calmodulins vernachlässigbar.

Sie liegt im Bereich der Fehlergrenze des Testes.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, daß in unserem System nur freies Calmodulin ubiquitiniert werden kann.

4.3.7. Einfluß der Sulfolandenaturierung und anschließende Renaturierung des Calmodulins (Sulfolanbehandlung) auf dessen Ubiquitinierbarkeit

J. Kaiser und H. P. Jennissen (unveröffentlicht) zeigten, daß eine Sulfolanbehandlung von Calmodulin einen Einfluß auf dessen K_m -Wert zur Aktivierung der Phosphorylase Kinase haben kann.

Es lag deshalb nahe, den Einfluß einer solchen Sulfolanbehandlung auf die Ubiquitinierbarkeit des Calmodulins zu untersuchen.

Aus Tabelle 15 geht hervor, daß sulfolanbehandeltes Calmodulin Ca^{2+} -abhängig von der FP-Sehparose eluiert werden kann. Ebenso ist die Calciumabhängigkeit der Ubiquitinierungsreaktion nicht beeinträchtigt.

Der Steigerung der Ubiquitinierung des sulfolanbehandelten Calmodulins in Gegenwart von Calcium um das 2,5-fache steht eine Erniedrigung des K_m -Wertes zur Aktivierung der Phosphorylase Kinase auf etwa die Hälfte gegenüber. Daraus folgt, daß die Erhöhung der Ubiquitinierung des sulfolanbehandelten Calmodulins nicht auf dessen Denaturierung beruhen kann.

Tabelle 15: Ubiquitinierung von CaM u. CaM-Sulfolan

Protein	Netto cpm	spez. Akt. nUnits/mg Lysatprotein	uCaM (nM)	% Ubiquiti- nierung	K _m (nM)
CaM Sulf.	+Ca ²⁺	64756	603	230	254
	-Ca ²⁺	622	6	2,2	2,44
CaM unbeh.	+Ca ²⁺	25470	237	90,6	100
	-Ca ²⁺	0	0	0	0

Die Bestimmung erfolgte mittels FP-Test (3.2.4.2.). Es ist die Calmodulin-abhängige Ubiquitinierung angegeben (Def.: 3.2.4.3.).

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 0,50 mg/ml Calmodulin, 6,4 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,043 mg/ml ¹²⁵J-Ubiquitin (3,28*10⁸ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Ebenso enthielten die Ansätze noch folgende Endkonzentrationen von EGTA und Ca²⁺:

Der Ansatz -Ca²⁺ enthielt zusätzlich 1 mM EGTA.

Der Ansatz +Ca²⁺ enthielt 1,1 mM Ca²⁺ und 1 mM EGTA.

Zur Sulfolandenaturierung und anschließender Renaturierung des Calmodulin siehe 3.1.4.4.

Die Angaben der spezifischen Aktivitäten beziehen sich auf die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität (siehe 3.2.4.3.).

Die K_m-Werte geben die Konzentrationen der Calmoduline zur halbmaximalen Aktivierung der Phosphorylase Kinase an (zur Durchführung siehe 3.2.6.).

Sulfolan selbst (bis zu 50 mM Endkonzentration) hat keinen Einfluß auf die Ubiquitinierungsreaktion (nicht gezeigt).

4.3.8. Kinetik der Ubiquitinierung von Calmodulin

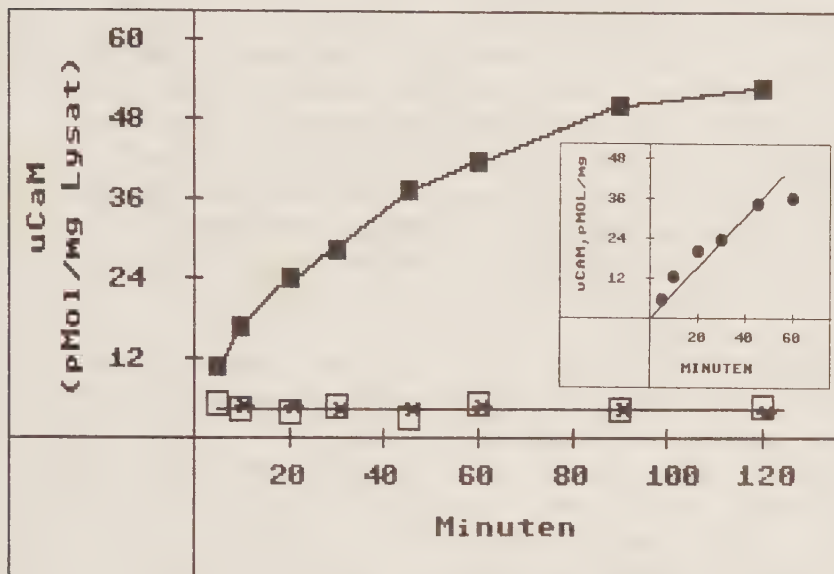
Die Kinetik der Konjugatbildung ist in Abbildung 17 wiedergegeben. Sie wurde mittels FP-Test bestimmt.

Der zeitliche Verlauf der Ubiquitinierung von Calmodulin folgt einer Sättigungskurve. Bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit wird die Hälfte des 120-Minuten-Wertes erreicht. Die spezifische Aktivität des Enzyms fällt von 1150 nUnits/mg nach 5 Minuten auf 400 nUnits/mg nach 120 Minuten. Der Referenzwert von 60 Minuten betrug 610 nUnits/mg. Die prozentuale Ubiquitinierung des eingesetzten Calmodulins (2,99 nMol/Ansatz) stieg von 0,12 % nach 5 Minuten auf 1 % nach 120 Minuten. Der Einbau von Ubiquitin in Calmodulin-Konjugate erhöhte sich von 0,66 % auf 5,5 % zu den oben angegebenen Zeiten.

Zeitabhängig ließ sich keine Steigerung der EGTA-eluierbaren Radioaktivität in den Kontrollansätzen ohne Calmodulin oder ohne ATP, aber mit Calmodulin, feststellen.

In einem Parallelversuch wurde einem Ubiquitinierungsansatz nach 60 min erneut Enzym zugegeben und die Menge des Konjugates 1. Ordnung nach weiteren 30 min bestimmt. Es ergab sich hierbei keine Steigerung der Konjugatmenge gegenüber der Kontrolle ohne nochmaligen Enzymzusatz (nicht gezeigt).

Abbildung 17: Kinetik der Ubiquitinierung von Calmodulin



Aufgetragen wurde die gebildete Menge an Calmodulin-Konjugat pro mg Enzym gegen die Inkubationszeit. Die Konjugatmenge wurde im FP-Test bestimmt (3.2.4.2.). Die Radioaktivitäten der Kontrollen wurden nicht subtrahiert.

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,1 mg/ml kreatinkinase, 6,4 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,047 mg/ml ^{125}J -Ubiquitin ($9,41 \cdot 10^7$ cpm/mg) und 0,5 mg/ml Calmodulin (sulfolanbehandelt) als Endkonzentrationen.

Zu den Ansätzen -ATP wurden kein ATP/ Mg^{2+} und kein ATP-regenerierendes System zugesetzt.

Zu den angegebenen Zeiten wurden aus den Inkubationsansätzen Aliquote von je 0,1 ml entnommen.

Geschlossene Quadrate: +CaM +ATP

offene Quadrate : +CaM -ATP

Sterne : -CaM +ATP

Insert: Die Werte der Kontrolle -CaM wurden von den Probenwerten subtrahiert.

4.3.9. Einfluß der Ubiquitinkonzentration auf die Ubiquitinierung von Calmodulin

Abbildung 18 zeigt die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Ubiquitin-konjugierenden-Systems von der Ubiquitinkonzentration. Die Berechnungen basieren auf der ATP-abhängigen Ubiquitinierung (Definition 3.2.4.3). Die spezifische Aktivität wurde nach 60 Minuten bestimmt. Aus den angegebenen Werten läßt sich leicht die Menge des ubiquitinierten Calmodulins berechnen (Definition der Ubiquitinierungs-Unit siehe 3.2.4.3.).

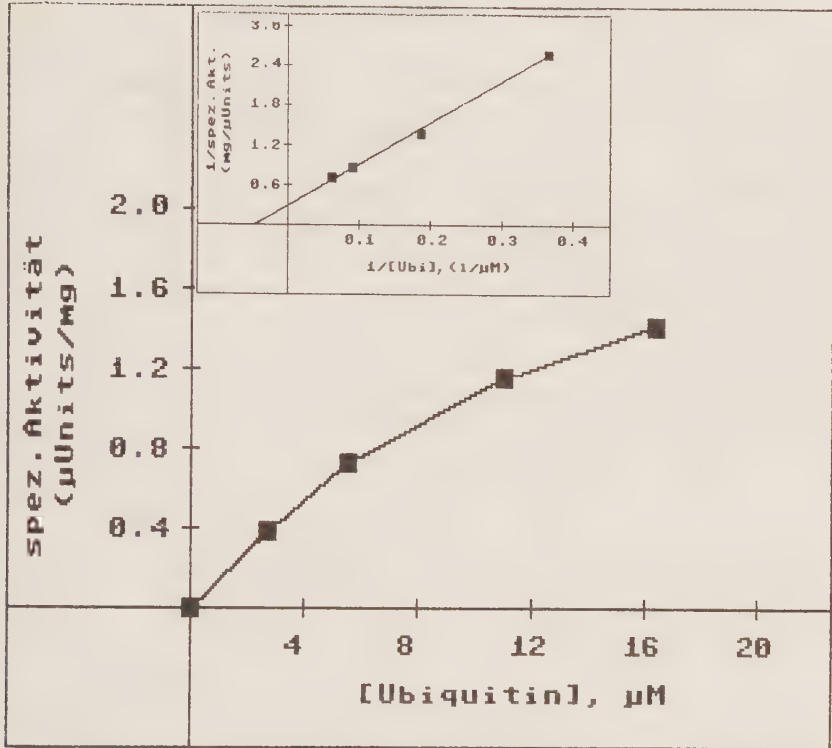
Die gezeigte Kurve läßt sich im Lineweaver-Burk-Diagramm linearisieren. Der ermittelte apparente K_m -Wert betrug 19,3 μ M bzw. 164 mg/l.

Die spezifische Aktivität erhöht sich von 380 nUnits/mg bei einer Ubiquitinkonzentration von 2,73 μ M auf 1420 nUnits/mg bei 16,4 μ M. Der Anteil des ubiquitinierten Calmodulins steigt von 0,42 % auf 1,82 %.

4.3.10. Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins von der Enzymkonzentration

Diese Abhängigkeit ist in Abb. 19 wiedergegeben. Die Berechnungen der spezifischen Aktivitäten basieren auf der ATP-spezifischen Ubiquitinierung (Definition siehe 3.2.4.3.). Die spezifische Aktivität fällt von 1000 nUnits/mg bei einer Lysatkonzentration von 3,18 mg/ml auf ca. die Hälfte von 540 nUnits bei einer Konzentration von 12,7 mg/ml. Die Menge des umgesetzten Ubiquitins als auch die des Cal-

Abbildung 18: Einfluß der Ubiquitinkonzentration auf die Ubiquitinierung von Calmodulin



Aufgetragen wurde die spezifische Aktivität des ubiquitinierenden Systems (ATP-abhängige Ubiquitinierung siehe 3.2.4.3.) gegen die Ubiquitinkonzentration. Die Bestimmung erfolgte im FP-Test (siehe 3.2.4.2.).

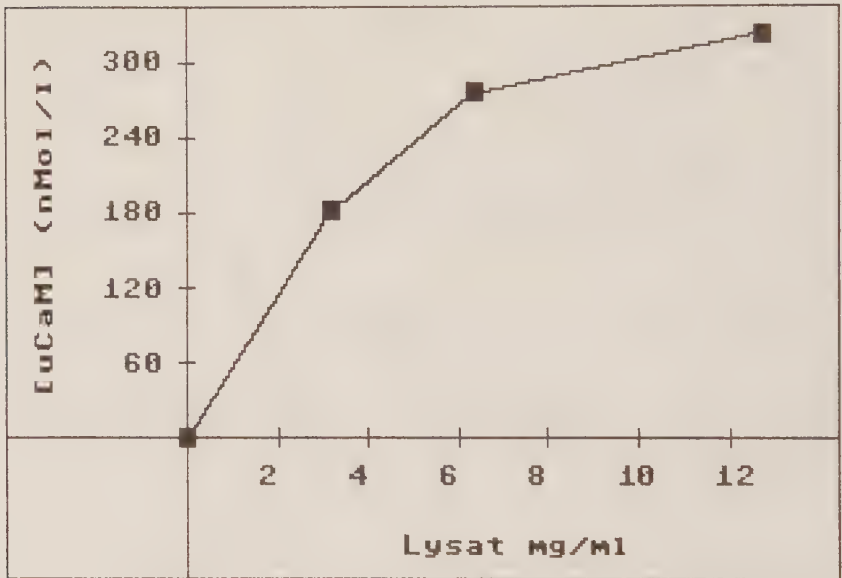
Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 6,4 mg/ml Reticulozytenlysat und 0,5 mg/ml Calmodulin (sulfolanbehandelt).

Die spezifische Radioaktivität des eingesetzten Ubiquitins betrug $2,49 \cdot 10^6$ cpm/mg.

Insert: Lineweaver-Burk-Diagramm

Abbildung 19: Einfluß der Enzymkonzentration auf die Ubiquitinierung von Calmodulin



Aufgetragen wurde die Konzentration der Calmodulin-Konjugate in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Die Bestimmung erfolgte im FP-Test (siehe 3.2.4.2.). Die Berechnung der Konjugatkonzentrationen erfolgte auf der Basis der ATP-abhängigen Ubiquitinierung (siehe 3.2.4.3.). Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mM CaCl₂, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 0,5 mg/ml Calmodulin (sulfolanbehandelt) und 0,047 mg/ml Ubiquitin (2,49*10⁹ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Die Messungen erfolgten bei folgenden Enzymkonzentrationen: 3,18 mg/ml, 6,36 mg/ml und 12,72 mg/ml.

modulins steigt von 3,3 % bzw. 0,6 % bei 3,18 mg/ml auf 5,8 % bzw. 1,1 % bei 12,7 mg/ml.

4.3.11. Einfluß der Calmodulinkonzentration auf die Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität

Die Aktivität des Enzymsystems ist von der Substratkonzentration (=Calmodulin) abhängig (Abb. 20). Eine scheinbare Sättigung wird bei einer Konzentration von 30 μ M erreicht. Der apparente K_m -Wert für Calmodulin, mittels nichtlinearer Anpassung nach Cleland (1967) berechnet, beträgt $8,1 \pm 3,1 \mu$ M (V_{max} (apparent) = 701 ± 82 nUnits/mg). Der Anteil des konjugierten Calmodulins (CaM), im Verhältnis zum eingesetzten, steigt von 0,35 % (bei 60 μ M CaM) auf 1,7 % (bei 3,74 μ M CaM).

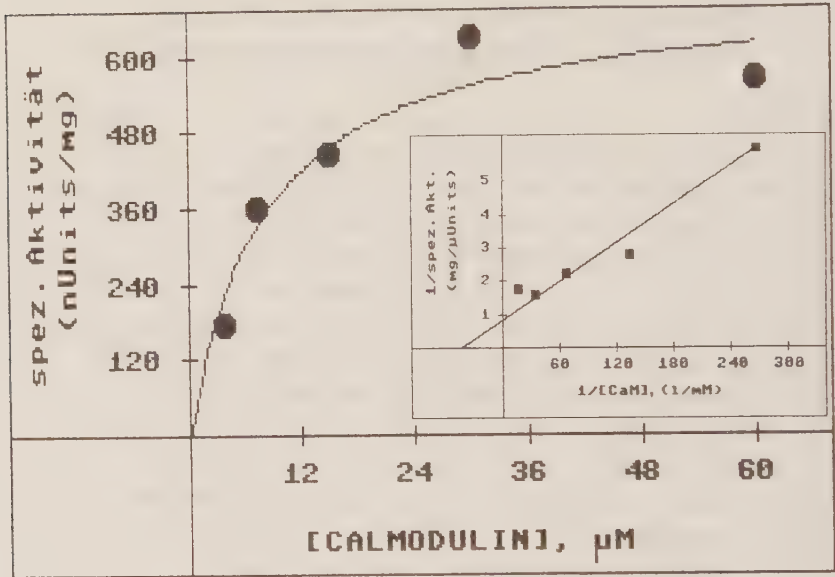
4.3.12. Einfluß von Hämin auf die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität

Nach A. Haas und I. Rose (1981) soll Hämin die Proteolyse wesentlich stärker hemmen als die ATP-abhängige Ubiquitinierung von Proteinen. Diese sollen zwar langsamer akkumulieren, aber bereits nach 30 Minuten ein höheres Niveau als in Ansätzen ohne Hämin erreichen.

In Abbildung 21 ist die Menge des gebildeten Konjugates in Abhängigkeit von der Häminkonzentration dargestellt. Die Ubiquitinierungsrate eines Kontrollansatzes ohne Hämin wurde als 100 % gesetzt.

Es zeigt sich, daß der 100 %-Wert nicht überschritten wurde. Es kommt demzufolge zu keiner erhöhten Ubiquitinierung

Abbildung 20: Einfluß der Calmodulinkonzentration auf die Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität



Aufgetragen wurde die spezifische Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (im Lysat) in Abhängigkeit von der Calmodulinkonzentration.

Die Bestimmung erfolgte im FP-Test (siehe 3.2.4.2.).

Zur Definition der Ubiquitinierungs-Unit siehe 3.2.4.3.

Die Berechnung erfolgte auf der Basis der Calmodulin-abhängigen Ubiquitinierung (siehe 3.2.4.3.)

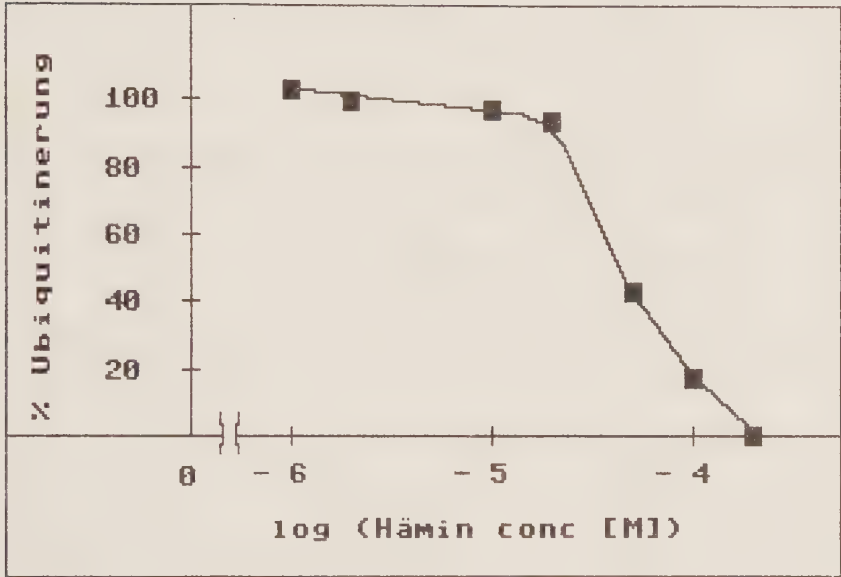
Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 0,1 mM CaCl_2 , Calmodulin (3,75 μM ; 7,5 μM ; 15 μM ; 30 μM ; 60 μM) und 0,047 mg/ml Ubiquitin ($2,06 \cdot 10^6$ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Die Graphik wurde mit einer nichtlinearen Anpassung erstellt.

Insert: Lineweaver-Burk-Diagramm

Abbildung 21: Einfluß von Hämin auf die Ubiquitinierung von Calmodulin



Aufgetragen wurde die Ubiquitinierbarkeit von Calmodulin in Abhängigkeit von der Häminkonzentration.

Die Bestimmung erfolgte im FP-Test (3.2.4.2). Als 100 % Wert wurde die Ubiquitinierung von Calmodulin in Abwesenheit von Hämin definiert.

Die Inkubationsansätze enthielten in einem Ansatzvolumen von 0,1 ml:

50 mM Tris/HCl, 1 mM DTE, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Phosphokreatin, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, 6,4 mg/ml Lysatprotein, 0,5 mg/ml Calmodulin und 0,047 mg/ml Ubiquitin ($9,47 \cdot 10^7$ cpm/mg) als Endkonzentrationen.

Die Messungen erfolgten bei folgenden Häminkonzentrationen:

1 μ M, 2 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M.

Die Bestimmung erfolgte im FP-Test (siehe 3.2.4.2.).

in Gegenwart von Hämin.

Ab einer Konzentration von 20 μ M Hämin ist eine Hemmung meßbar. Bei einer Konzentration von 0,2 mM kam die Ubiquitinierung völlig zum Erliegen.

Die Häminkonzentration zur halbmaximalen Hemmung betrug ca. 48 μ M.

4.4. Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozytenlysat

4.4.1. Anreicherung über DEAE-Sephacel

Die Anreicherung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease aus Reticulozytenlysat über DEAE-Sephacel war seit langem bekannt (Diechanover et al., 1978). Sie wurde hauptsächlich zur Abtrennung des endogenen Ubiquitins eingesetzt. Die weitgehend ubiquitinfreie über DEAE-Sephacel angereicherte Protease wurde APF II (ATP-Dependent Proteolytic Factor II) genannt.

Es lagen jedoch keine Untersuchungen bezüglich der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität vor, da bisher geeignete Meßverfahren fehlten.

In Tabelle 16 sind die Anreicherungen hinsichtlich der proteolytischen und der ubiquitinierenden Aktivität aus 3 separaten Präparationen einander gegenübergestellt.

Die Anreicherung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease war in allen Präparationen ca. 2-3-fach. Dem stehen Literaturwerte (Gehrke, 1987) von ca. 5-fach gegenüber (siehe Diskussion).

Die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität wurde ca. 8-11-fach anreichert. Die Ausbeute betrug zwischen 68 und 95 %. Die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität gegenüber der ATP-abhängigen Protease war zwischen 3,7-6,2-fach. Dies zeigt erstmals, daß sich beide Systeme auf DEAE-Sephacel unterschiedlich verhalten.

Tabelle 16: Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden Aktivität aus Reticulozytenlysat

VOLUMEN		PROTEIN		ATP- UND UBIQUITIN-ABH. PROTEASE			UBIQUITIN-KONJUGIERENDE AKTIVITÄT					
ml	mg/ml	gesamt	Ausbeute	ml/liter/ mg	gesamt Akt. (Units)	Aus- beute	Anreich. μUnits/ mg	gesamt Akt. (μUnits)	Aus- beute	Anreich.		
Lysat	60	31.65	1899	100	60.8	115.5	100	1	0.51	968	100	1
Eluat	26	6.12	159	8.3	109.7	17.3	15.0	1.8	4.14	658	68	8.12
Lysat	72	26.5	1908	100	31.3	59.8	100	1	0.43	820	100	1
Eluat	22	6.04	132	7.0	83	11.15	18.6	2.7	4.43	589	72	10.2
Lysat	58	47.82	2768	100	82.5	228	100	1	0.43	1190	100	1
Eluat	34.5	7.21	248	8.95	139.6	35	15.3	1.7	4.55	1120	95	10.6

Die Anreicherung über DEAE-Sephacel erfolgte gemäß 3.1.5.3.
Die Aktivität der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease wurde nach 3.2.1.
bestimmt. Die Aktivität der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität nach 3.2.4.2
und 3.2.4.3. ermittelt. Es wurde hierbei die ATP-abhängige Ubiquitinierung
bestimmt (siehe 3.2.4.3).

"Lysat"=Reticulozytenlysat = Säulenauftrag
"Eluat"=angereicherte Emzymfraktion=APF II

4.4.2. Weiterreinigung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (UCA) durch Affinitätschromatographie

Diese Anreicherung erfolgte aus APF II durch eine Affinitätschromatographie mit Ubiquitin-Sepharose.

Die erzielte Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität (UCA) war je nach eingesetztem Substratprotein unterschiedlich. Für Calmodulin als Substrat war sie ca. 1,5-fach. Bezüglich der oxidierten RNase ließ sich mit Hilfe der autoradiographischen Methode ein Anreicherungs-faktor von ca. 7 bestimmen.

Ein Vergleich mit Literaturwerten ist schwierig, da die Autoren die Reinigungsfaktoren stets nur für die Unter-einheiten der ubiquitinierenden Aktivität angeben.

So gibt Ciechanover et al. (1982) eine ca. 170-fache Reinigung für das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) an.

In Abbildung 22 wird die Reinigung der UCA hinsichtlich des Substrates RNase gezeigt.

Im Ansatz mit affinitätsgereinigter UCA (Bahn 1) ist gegenüber des Ansatzes mit APF II (Bahn 6) eine wesentlich stärkere Schwärzung der Hauptbande zu sehen. Auch treten die Konjugate 2. und 3. Ordnung deutlich hervor, die in Abbildung 16 bei Inkubation der RNase mit Lysat (Bahn 4,5) nicht zu sehen waren. Ein direkter Vergleich beider Abbildungen ist nicht möglich, da in den Inkubationsansätzen der Abbildung 22 zur Einsparung des aufwendig zu präparierenden radioaktiven Ubiquitins nur die Hälfte eingesetzt wurde.

Die gezeigten Daten sind zunächst als positives Signal dafür zu werten, daß die gewählte Gelmatrix, die Aktivierungsmethode und der Substitutionsgrad zur weiteren Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität geeignet sind. Diese Methode bedarf sicherlich noch der Optimierung.

Abbildung 22: Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus APF II durch Affinitätschromatographie (Autoradiogramm)
(Legende umseitig)



Abbildung 22: Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus APF II durch Affinitätschromatographie (Autoradiogramm)

Die Ubiquitinierung wurde nach 3.2.3. ausgeführt. Die Reaktion wurde nach 60 min durch Zugabe von 0,02 ml ME (99 %), 0,02 ml SDS (10 %) und 0,025 ml Probenpuffer nach Laemmli (1970) gestoppt. Danach wurden die Proben für 5 min auf ca. 100° erhitzt und gelelektrophoretisch nach 3.2.8.1. (Gradientengel 10-20 % Polyacrylamid) aufgetrennt. Das Autoradiogramm wurde nach 3.2.9. angefertigt. Nicht konjugiertes ^{125}J -Ubiquitin ($2,7 \cdot 10^8$ cpm/mg) bildet die vordere Radioaktivitätsbande.

- Bahn 1: 40 µg ox. RNase + 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 25 µg affinitätsgereinigte UCA
- Bahn 2: Kontrolle: 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 25 µg affinitätsgereinigte UCA
- Bahn 3: 40 µg Lysozym + 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 25 µg affinitätsgereinigte UCA
- Bahn 4: 40 µg Cytochrom C + 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 25 µg affinitätsgereinigte UCA
- Bahn 5: Kontrolle: 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 25 µg affinitätsgereinigte UCA
- Bahn 6: 40 µg ox. RNase + 2,5 µg ^{125}J -Ubiquitin + 88 µg APF II

5. DISKUSSION

5.1. Ubiquitin

Als Voraussetzung für die vorliegende Arbeit war die Isolierung und die Charakterisierung des eingesetzten Ubiquitins nötig.

Durch die Modifikation der Präparation nach Jennissen und Gehrke (Gehrke, 1987) wurde die Ausbeute um den Faktor 3 erhöht. Aufgrund einer zusätzlichen Gelfiltration konnten in der SDS-Gelelektrophorese keine Verunreinigungen festgestellt werden (Abb. 5), was durch die Aminosäurenanalyse des Polypeptides (Tab. 5) ebenfalls bestätigt wurde. Diese Analyse schloß ebenfalls eine präparativ bedingte Abspaltung der beiden terminalen Glycinreste (=Ubiquitin-T) aus. Eine solche kann bei anderen Arbeitsgruppen festgestellt werden (Loir et al., 1984, Schlesinger et al., 1975) und ist mit dem Verlust der biologischen Aktivität verbunden (Wilkinson und Audhya, 1981).

Der endgültige Beweis der völligen biologischen Funktionstüchtigkeit wurde durch die Aktivierung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease erbracht (Abb. 6). Der ermittelte K_m -Wert stimmte mit den Werten von Ciechanover et al. (1980b) und Gehrke und Jennissen (1987) überein.

Auch die apparente molekulare Masse des Ubiquitins in der SDS-Gelelektrophorese von ca. 5,7 kDa stimmt mit dem von Ciechanover et al. (1980b) und Viestra et al. (1985) bestimmten Wert von 5,5 kDa gut überein, wobei der Unterschied zu seiner wirklichen molekularen Masse von 8,5 kDa (Hershko, 1983) vermutlich auf das von Williams und Gratzner (1971) beschriebene abnorme Laufverhalten von kleinen Polypeptiden im Laemmli-System zurückzuführen ist (Ciechanover et al., 1980b).

Der Zusatz von radioaktiv markiertem Ubiquitin ermöglichte die neue Reinigungsmethode (Ersatz der Ammoniumsulfatfäll-

lung durch TCA-Fällung, Unterlassung des zweiten Hitzeschrittes, Einführung der Gelfiltration in Gegenwart von Essigsäure), hinsichtlich ihrer Effektivität zu überprüfen (Tab. 1) und lieferte so Anhaltspunkte für Verbesserungen bei späteren Präparationen. Diese Hauptintention des Versuches wird auch nicht durch den Fehler hinsichtlich der Gesamtanreicherung und -ausbeute geschmälert. Da in der Reinigungstabelle nur Pool II des CM-Sephadexlaufes (Abb. 3) berücksichtigt wurde, führte dieser Schritt zu zu niedrigen Werten für diese beiden Größen. Da in Pool I ca. 80 % der Radioaktivität aber nur 0,1 % des Proteins von Pool II durchliefen, liegen die tatsächlichen Gesamtanreicherungen und -ausbeuten ab diesem Schritt um ca. 1,8-fach höher als in der Reinigungstabelle angegeben.

Bei der Poolbestimmung des Ubiquitins wurde bereits in 4.1.1.5. darauf hingewiesen, daß die Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Isotopenverdünnungsmethode nicht gegeben war, da bei der Ionenaustauschchromatographie zwei Radioaktivitätspeaks, aber nur ein Ubiquitinpeak erhalten wurde. Dies führte zu einer zu niedrigen spezifischen Radioaktivität des Elutionspools (nur dieser Pool wurde weiter gereinigt). Die Poolbestimmung wurde deshalb nur als grobe Abschätzung des Ubiquitingehaltes vorgenommen. Sie zeigt gleichzeitig, daß Chloramin-T jodiertes Ubiquitin als Tracer für ein solches Experiment nicht geeignet erscheint. Auf die Bedeutung der Markierungsmethode für den Tracer weist Kaiser (1988) hin.

Die grobe Abschätzung des Ubiquitingehaltes kann jedoch hinsichtlich des nachvollziehbaren Methodenfehlers bei der Ionenaustauschchromatographie korrigiert werden. Dadurch ergibt sich eine bessere Übereinstimmung mit den Werten, die mit anderen Methoden bestimmt wurden.

Eine Korrektur wird möglich durch die Addition der Radioaktivitäten und Proteinmengen von Pool I und Pool II des CM-Sephadexlaufes, da Pool I 80 % der Radioaktivität und nur

0,1 % der Proteinmenge von Pool II enthielt. Damit erhöht sich die spezifische Radioaktivität des CM-Sephadexpools auf das 1,8-fache und somit analog hierzu die spezifische Radioaktivität des Endproduktes nach der Gelfiltration von 756 cpm/mg auf 1372 cpm/mg.

Unter Benutzung der Formel nach 4.1.1.5. errechnet sich hierdurch ein Wert von 223 mg Ubiquitin pro l Blut. Dies entspricht bei einem durchschnittlichen Hämatokrit von 39 % (Schulze et al., 1980) einem Gehalt von 0,571 mg Ubiquitin/ml Erythrozyten.

Diesem Wert steht ein mittels kompetitivem Radioimmunoassay ermittelter Wert von 0,393 mg/ml Erythrozyten gegenüber (Gehrke, A. und Jennissen, unveröffentlicht), der als der realistischere anzusehen ist.

Die Isolierung des Ubiquitins aus Schweineherzen führte auch im zweiten untersuchten Gewebe zum Nachweis eines biologisch aktiven Ubiquitins (Konzentration zur halbmaximalen Aktivierung der ATP -und Ubiquitin-abhängigen Protease = 0,018 mg/ml). Dieser Nachweis wurde durchgeführt, weil Gehrke und Jennissen (1987) wohl eine Ubiquitinierung von Proteinen dieses Gewebes feststellen konnten, nicht aber eine Ubiquitin-abhängige Proteolyse.

Die Bestimmung der Poolgröße des Ubiquitins im Herzmuskel weist die gleichen Mängel auf, wie sie bereits in der Diskussion des Erythrozytenubiquitins aufgezeigt wurden (siehe Abb. 7).

Die grobe Schätzung des Ubiquitinpools liegt ca. 6-7-fach höher als der Wert, der mittels kompetitivem Radioimmunoassay bestimmt wurde (70-80 mg/ml; Gehrke und Jennissen, 1987), der sicherlich ebenfalls realistischer als der ermittelte Wert von 463 mg/kg ist. Die große Abweichung ist sicherlich auf eine vermehrte Proteolyse des chemisch modifizierten Tracers durch die große Menge an intrazellulären Proteasen in diesem Gewebe zurückzuführen.

5.2. Ubiquitinierung bekannter Substratproteine

Durch den Einsatz bekannter, guter Substratproteine für die Ubiquitinierung war ein Vergleich der Eigenschaften der benutzten Enzympräparationen mit denen aus der Literatur möglich.

Als Grundlage hierfür wurde lediglich der Einbau von radioaktiv markiertem ^{125}J -Ubiquitin herangezogen, obwohl auch eine Substratmarkierung möglich wäre (Hershko et al., 1986; Hough und Rechsteiner, 1986).

Dies lag in dem Wunsch begründet, daß die Ubiquitinierung nativer Substrate untersucht werden sollte und bisher bei den beiden möglichen Markierungsmethoden lediglich für ^{125}J -Ubiquitin (Chloramin-T Methode) der Nachweis der vollen biologischen Aktivität erbracht wurde (Gehrke und Jennissen, 1987). Während Kaiser (1988) bei der Radioaktivmarkierung des Calmodulins mit Chloramin-T (Van Eldik und Wattersen, 1981) einen völligen und bei der Methode nach Bolton und Hunter (1973) einen teilweisen Verlust der biologischen Aktivität dieses Proteins feststellte.

Bei der Inkubation von ox. RNase (10 Lysine, freie Alpha-NH₂-Gruppe; Dayhoff, 1972) ., wie auch von Lysozym (6 Lysine, freie Alpha-NH₂-Gruppe; Canfield 1963) entstanden im Vergleich zu den Kontrollansätzen ohne diese Substratproteine neue Radioaktivitätsbanden (Abb. 16, Abb. 22), die auch nach Kochen in 2 % (w/v) SDS und 5 % (v/v) ME stabil waren. Dies schloß das Vorliegen einer nicht kovalenten bzw. einer Disulfidbindung aus (Shapiro et al., 1967). Deshalb wurde auf eine, von Hershko et al. (1980) nachgewiesene, Amidbindung geschlossen.

Ebenso konnte für beide Substrate gezeigt werden, daß es sich bei den neu entstandenen Radioaktivitätsbanden jeweils um Konjugate handelte, die aus einem Substratmolekül und einem oder mehreren Ubiquitinen bestanden. Dies wurde aus den Molekulargewichtsdifferenzen zwischen den Substraten und den daraus entstehenden Konjugaten geschlossen (Tab. 3

und 4) und findet sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Hershko et al., 1980).

Bei beiden Substraten konnten 3 Konjugatordnungen eindeutig identifiziert werden (Abb. 16, Abb. 22). Konjugate höherer Ordnungen konnten aufgrund ihrer geringen Menge und der Überstrahlung durch Konjugate endogener Proteine nicht nachgewiesen werden.

Hershko et al. (1986) wiesen für die ox. RNase mindestens 7 Konjugatordnungen nach. Für Lysozym fanden Hershko und Heller (1985) 12 Konjugatbanden mit molekularen Massen von über 100 kDa. Die Autoren benutzten hierzu radioaktiv markiertes Substratprotein oder mit ^{125}J -Ubiquitin zusammen hoch gereinigte Enzymfraktionen.

Für alle Substrate konnte nicht beantwortet werden, ob es sich bei den Konjugaten höherer Ordnungen um Amidbindungen zwischen Substratprotein und einem Ubiquitinmolekül handelte, oder ob eine Ubiquitinierung eines kovalent gebundenen Ubiquitins stattfand (Hershko und Heller, 1985).

In beiden Fällen wäre eine Erhöhung der molekularen Masse um 5,7 kDa feststellbar. Jedoch fanden beide Autoren eine signifikante Bildung von Polyubiquitinketten erst ab Konjugaten 6. Ordnung. Diese Kettenbildung ist auch für das Auftreten von mehr als siebenfach ubiquitinierten Lysozymen verantwortlich.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppen (Hough et al., 1986) steht der Befund, daß die Ubiquitinierung des Lysozyms nicht Calcium-abhängig ist (Abb. 16, Bahn 7+8).

5.3. Ubiquitinierung des Calmodulins

Die Ubiquitinierung des Calmodulins ist insofern interessant, da Calmodulin das wichtigste Akzeptorprotein für den "second messenger" Ca^{2+} ist (Cheung, 1985) und somit eine wichtige Rolle in der Steuerung des Zellmetabolismus einnimmt.

Neben diesen auf Calmodulin bezogenen Aspekten ermöglicht dieses Protein mit Hilfe des neu entwickelten FP-Testes eine präzise und schnelle Charakterisierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität.

Es wurden für Säugercalmodulin erstmals Konjugate höherer Ordnungen (Def.: 3.2.3.) nachgewiesen.

Bisher konnten 4 Konjugatbanden mit der Gelelektrophorese in Gegenwart von EGTA eindeutig identifiziert werden (Abb. 8,16), jedoch wurden das 27,6 kDa- und das 29,5 kDa-Konjugat der Doppelbande des EGTA-Systems als unterschiedliche Spezies eines monoubiquitinierten Calmodulins angesehen. Grund hierfür war, daß die Differenz der molekularen Massen zwischen beiden Proteinen nur das 0,4-fache der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins ausmachte, während die Erhöhungen der molekularen Masse der beiden anderen höher-molekularen Konjugate (35,5 kDa, 41,4 kDa) gut mit der apparenten molekularen Masse des Ubiquitins korrelierten (Tab. 6). Einen weiteren Hinweis darauf ergibt die Aminosäurenanalyse (4.3.3.4.3.), die beide Konjugate umfaßte, denn hier wurden 80 % des erwarteten Trimethyllysins gefunden, das für ein 1:1 Konjugat berechnet wurde. Bei einem Gemisch aus mono- und diubiquitiniertem Calmodulin hätte die Menge höchstens 66 % des erwarteten Wertes ausmachen dürfen.

Die 27,5 kDa-Bande könnte ein Proteolyseprodukt der 29,6 kDa-Bande sein. Ein Hinweis dafür ist die mangelhafte Über-

einstimmung der Ergebnisse der Aminosäurenanalyse, die beide Proteine umfaßte, mit den erwarteten Werten.

Ebenso kann der Ort der Ubiquitinierung, da 7 Lysine zur Verfügung stehen, einen Einfluß auf das Calciumbindungsvermögen oder auf die Art und den Umfang des Ca^{2+} -induzierten Konformationswechsels haben. Die Konformation des Calmodulins ist jedoch ausschlaggebend für die Mobilität des Proteins in der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 12).

Auch ist an eine Artefaktbildung durch die Aufspaltung eines homogenen Proteins in 2 mit Coomassie angefärbte Banden im Laemmli-System zu denken.

Dafür, daß es sich bei dem Konjugat 1. Ordnung um ein mono-ubiquitiniertes Calmodulin handelt, sprechen neben der Aminosäurenanalyse die Ergebnisse von Gregori et al. (1987). Diese Arbeitsgruppe fand für Dictyostelium und bakteriell synthetisiertem Hühnercalmodulin bei nachgewiesenen mono-ubiquitinierten Konjugaten ebenfalls eine Erhöhung der molekularen Masse von 9 kDa gegenüber dem unkonjugierten Protein. Darauf aufbauend wurden die beiden höhermolekularen Konjugate (Tab. 6) als di- und triubiquitinierte Calmoduline angesehen.

Aus dem Vergleich der Ubiquitinierungsraten der Konjugate 1.-3. Ordnung (Tab. 7) geht hervor, daß das Konjugat erster Ordnung ca. 95 % der Gesamtkonjugatmenge ausmacht.

Es war hierbei jedoch nicht möglich, zwischen den beiden Banden (27,6 kDa und 29,5 kDa) der Doppelbande, die bei der Elektrophorese in Gegenwart von EGTA auftritt, zu differenzieren, da sich ihre Peakflächen bei der autoradiographischen Methode immer zum Großteil überschneiden. Jedoch stellt die 29,5 kDa-Bande im EGTA-System eindeutig den Hauptanteil am Konjugat 1. Ordnung. Deshalb wurde dieses Protein als die "Hauptbande" und das 27,6 kDa-Protein als die "Nebenbande" der Doppelbande des Konjugates 1. Ordnung bezeichnet.

Trotz der geringen Mengen ist der erstmalige Nachweis von

Konjugaten 2. und 3. Ordnung ein wichtiger Befund, da hierdurch ein Hinweis darauf gegeben ist, daß mehrere Lysine ubiquitinierbar sind. Sie werden somit ein gewichtiges Gegenargument zur "Trimethyllysin Hypothese" von Gregori et al. (1985) (siehe 2.4), auf die im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen wird (siehe 5.5.).

Bei der Charakterisierung der Calmodulin-Ubiquitin-Konjugate zeigte sich, daß diese Eigenschaften besitzen, wie sie für Calmodulin charakteristisch sind. Dadurch konnte nachgewiesen werden, daß die Konjugate wirklich Calmodulin enthalten.

So war mit den Konjugaten eine Ca^{2+} -abhängige Affinitätschromatographie an FP-Sepharose möglich, die für Ubiquitin nicht gegeben ist (siehe Abb. 10 und 11).

Ebenso waren die Konjugate 1. und 2. Ordnung noch zu einer Ca^{2+} -abhängigen Mobilitätsänderung im System nach Williams (1984) fähig. In diesem System (2 Bahnen mit Ca^{2+} , 1 Bahn mit EGTA) zeigte das Calmodulin über diese drei Bahnen einen sigmoiden Bandenverlauf (Abb. 12). Ein solcher war ebenfalls für das Paar 29,6 kDa-Bande (Hauptbande) im EGTA- und 27,7 kDa-Bande (Hauptbande) im Calcium-System gegeben, sowie für das Paar 27,5 kDa-Bande (Nebenbande) im EGTA- und dem vorderen Rand der Konjugatfront (Nebenbande) im Calcium-System (Abb. 12). Aufgrund der deutlichen Übergänge der Banden eines jeden Paares wurden die Haupt- und Nebenbanden im jeweiligen System einander zugeordnet. Die Hauptbande im EGTA-System zeigte gegenüber der Hauptbande im Calcium-System einen "Calciumsprung" von ca. 2,3 kDa. Diese Änderung der molekularen Masse liegt damit durchaus im Bereich des reinen Calmodulins von 3,3 kDa.

Eine Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung ist bisher nur für Troponin C und Calmodulin beschrieben (Williams et al., 1984). Für Ubiquitin kann eine solche Änderung ausgeschlossen werden, da die auf dem Autoradiogramm (Abb. 12) eben-

falls sichtbaren Ubiquitinbanden keinen solchen Sprung aufweisen.

Daß der "Calzium-Sprung" der Konjugate kleiner ausfiel als bei reinem Calmodulin und bei dem Konjugat 3. Ordnung nicht mehr feststellbar war, ist sicherlich auf den Ubiquitinanteil im Molekül zurückzuführen.

Gleichzeitig verdeutlicht die Calzium-abhängige Mobilitätsänderung der Konjugate 1. und 2. Ordnung, daß diese Proteine noch das Calziumbindungsvermögen des Calmodulins beibehalten haben und dadurch noch einen Calzium-abhängigen Konformationswechsel ausführen können. Somit besteht noch die Möglichkeit, daß diese Proteine biologisch aktiv sind. Eine Überprüfung dieser Möglichkeit konnte noch nicht durchgeführt werden, da eine Isolierung der Konjugate bisher nur unter denaturierenden Bedingungen möglich war.

Ebenso legen die Calzium-abhängigen Eigenschaftsmodulationen des ubiquitinierten Calmodulins nahe, daß der Ubiquitinierung des Proteins keine Denaturierung vorausgeht.

Im Hinblick auf die "Trimethyllysin Hypothese" von Gregori et al. (siehe 2.4.) war natürlich die zur weiteren Charakterisierung durchgeführte Aminosäurenanalyse besonders wichtig.

Es wurde zwar insgesamt eine schlechte Übereinstimmung mit den theoretischen Werten festgestellt, jedoch ergeben sich eine gute Übereinstimmung für ASX, GLX, Phenylalanin, Leucin und mit ca. 20 % Abweichung für Serin, Trimethyllysin und Isoleucin. Die Werte für Methionin, Tyrosin und Trimethyllysin sind Methoden bedingt erniedrigt (siehe Kontrolle Tab. 10, Spalte I), während Glycin erhöht ist (durch Glycin in den Elektrophoresepuffern).

Die Analyse erbrachte dennoch einen Hinweis darauf, daß das Calmodulin-Konjugat noch Trimethyllysin enthält.

Die Menge des gemessenen Trimethyllysins (1,1 Nanomole/ml) entsprach ca. 80 % des nach Bestimmung der Radioaktivität

(1,37 Nanomole/ml) erwarteten Wertes. Die gemessene Menge dieser Aminosäure macht unwahrscheinlich, daß die gesamte nachgewiesene Menge von Calmodulinverunreinigungen in der Probe stammen könnte, denn dann hätte das Verhältnis von unkonjugiertem CaM zu Calmodulin-Konjugat 1:1 sein müssen. Eine solche Verunreinigung mit Calmodulin ist jedoch unwahrscheinlich, da die Distanz zwischen der Calmodulin- und der Konjugatbande auf der Nitrocellulose ungefähr gleich groß war wie bei SDS-Gelen mit 15 % Polyacrylamid (vergleiche Abb. 13). Zum anderen hätte man eine solche Verunreinigung, selbst bei der schlechten Anfärbbarkeit von TFA-eluierten Proteinen mit Coomassie-Blue sehen müssen (Abb.13, Bahn 2), auch unter der Berücksichtigung, daß Calmodulin ein geringeres Molekulargewicht hat. Eine Silberfärbung des Calmodulins ist bisher nicht möglich (Rochette-Egly und Stussi-Garaud, 1984).

Die Abweichungen bestimmter Aminosäuren von den erwarteten Werten liegen ganz sicher nicht an der Isolationsmethode, wie die Analyse des geblotteten und TFA-eluierten Calmodulins zeigt (Tab. 10, Spalte 1). Ebenso hat eine beginnende Proteolyse (Abb. 13, Bahn 2) keinen Einfluß.

Jedoch mußten, um ausreichende Mengen an Konjugat zu erhalten, wesentlich mehr Blotts durchgeführt und eluiert werden als zum Erhalt einer 10-fach höheren Calmodulinmenge nötig war. Hierdurch erhöhte sich die Möglichkeit einer Kontamination wesentlich, wobei eine solche Kontamination bei einer Menge von ca. 3 µg Konjugat pro Analyse natürlich prozentual höher ins Gewicht fällt als bei der wesentlich größeren Menge des analysierten Calmodulins.

Der Ursprung der breiten, niedermolekularen Bande im Bereich der Front, die in der Elektrophorese des TFA-eluierten Konjugates auf dem SDS-Gel sichtbar ist (Abb 13, Bahn 2), konnte nicht geklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei nicht um Protein, sondern um eine anderweitige Verunreinigung (eventuell Bestandteile der Nitrocellulose-

Membran), da diese Bande mit der Coomassie-Färbung eine braune Farbe zeigte und dieser Bande keine Radioaktivitätsbande auf dem Autoradiogramm entsprach.

Von großer Bedeutung war, ob das ubiquitinierende System zwischen den physiologischen Formen des Calmodulins in der Zelle zu unterscheiden vermag. Calmodulin kommt in der Zelle, je nach Erregungszustand, in Calcium-freier und in Calcium-gebundener Form vor (Cheung, 1980), wobei die Bindung des Calciums einen Konformationswechsel des Calmodulins bewirkt (Dedman et al., 1977). Letztere Form bindet an Enzyme und steigert deren Aktivität (Cheung, 1980). Neben dieser reversibel, enzymgebundenen Form (=peripher gebundenes Calmodulin) existiert noch eine integral gebundene Form als Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase (Grand et al., 1981).

Zu der Untersuchung der Ubiquitinierung dieser "verschiedenen" Calmoduline wurde eine neue Quantifizierungsmethode entwickelt, die auch zur Charakterisierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität eingesetzt wurde.

Es handelt sich hierbei um die Affinitätsadsorption an FP-Sepharose (FP-Test), die hochspezifisch ist für Calmodulin-Konjugate (siehe Abb. 15; Tab 11).

Tab. 12 zeigt, daß die Werte, die mit dem FP-Test und mit der ebenfalls neu entwickelten autoradiographischen Methode (siehe 3.2.4.1.) bestimmt wurden, gut korrelieren. Damit sind die Werte, die mit einer der beiden Methoden ermittelt werden, untereinander vergleichbar. Zum anderen macht die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden einen Methodenfehler bei der Bestimmung der Konjugatmengen unwahrscheinlicher.

Der Vorteil des FP-Testes liegt in der schnellen Ausführung und in seiner Sensitivität.

Es muß hierbei jedoch bedacht werden, daß bei dem FP-Test bestimmte Substrat-abhängige Eigenschaften eine Rolle spie-

len können. Dies wurde von Gehrke und Jennissen (1987) für BSA und Globin als Substrate für die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease gezeigt und wird ebenfalls für die affinitätschromatografisch angereicherte konjugierende Aktivität deutlich (siehe 4.4.2.).

Die autoradiographische Methode ist bei allen konjugierbaren Proteinen anwendbar. Sie ist jedoch im Vergleich zum FP-Test wesentlich aufwendiger.

Bei der Untersuchung der "verschiedenen" Calmoduline zeigte sich, daß nur die freie, Calcium-haltige Form des Calmodulins ubiquitiniert werden kann (Tab.13; Tab. 14).

Die Calcium-Abhängigkeit der Ubiquitinierung des Calmodulins (Tab. 13; Abb. 16) bedeutet, daß die Calcium induzierte Konformation des Proteins von ausschlaggebender Bedeutung für diese Reaktion ist (siehe hierzu auch 5.5.).

Eine Calciumabhängigkeit des ubiquitinierenden Systems kann hierbei ausgeschlossen werden, da die in Abb. 16 gezeigten Ansätze (mit und ohne Calcium), außer bei Calmodulin, keinen Unterschied im Ubiquitinierungsmuster erkennen lassen. Aus diesem Grunde ist auch eine gesteigerte Proteolyse eventuell doch vorhandener Calmodulin-Konjugate in Abwesenheit von Calcium auszuschließen, zumal eine enge Korrelation zwischen Ubiquitinierungs- und Proteolyserate besteht (Hershko et al., 1984).

Eine Ca^{2+} -abhängige Ubiquitinierung von Substratproteinen war bisher unbekannt. Jedoch scheint eine konformationsabhängige Ubiquitinierung für einige Phytochrome wahrscheinlich (Shanklin et al., 1987).

Des weiteren zeigte die Untersuchung der verschiedenen Bindungszustände des Calmodulins (freies Calmodulin, integral gebundenes Calmodulin, Ca^{2+} -abhängig gebundenes Calmodulin), daß sowohl das integral gebundene (=Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase) als auch das Ca^{2+} -abhängig gebundene Calmodulin (=peripher gebundenes Calmodulin)

vor einer Ubiquitinierung geschützt sind (Tab. 14). Dies war im ersten Falle um so erstaunlicher, da die liberalisierte Delta-Untereinheit ubiquitiniert werden kann (Tab. 14) und zumindest die Calcium- und Magnesiumbindungsstellen dieser Untereinheit im Holoenzym freiliegen sollten (Shenolikar et al., 1979). Hierbei stellt sich die Frage, ob die Lysine Nr. 21, 30 und 94, die Bestandteile dieser Bindungsstellen sind (Watterson et al., 1980), per se nicht ubiquitiniert werden können oder, ob durch die Assoziation der Delta-Untereinheit mit den anderen Untereinheiten eine Ubiquitinierung aus sterischen Gründen nicht mehr möglich ist. Im Falle des Ca^{2+} -abhängig gebundenen Calmodulins (=peripher gebundenes Calmodulin) stellt sich die Frage, ob eine Ubiquitinierung des Proteins nur an seiner Proteinbindungsstelle möglich ist, was eine Bevorzugung bestimmter Lysine zur Folge hätte oder, ob hier ebenfalls eine Ubiquitinierung aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Momentan kann eine Antwort hierauf noch nicht gegeben werden. Auf die mögliche biologische Bedeutung der Nichtubiquitinerbarkeit des Ca^{2+} -abhängig gebundenen Calmodulins wird im weiteren Verlauf der Diskussion eingegangen (siehe 5.5.). Die unterschiedlichen Ubiquitinierungsraten der freien Delta-Untereinheit und des Calmodulins (Tab. 14) sind sicherlich auf die unterschiedlichen Präparationsverfahren für diese beiden Proteine zurückzuführen.

Als weiterer Faktor, der die Eigenschaft des Calmodulins als Substrat für die Ubiquitin-konjugierende Aktivität beeinflusst, erwies sich die Sulfolandenaturierung und anschließende Renaturierung des Proteins (Tab 15). Sie erbrachte stets mindestens eine Verdoppelung der Ubiquitinierungsrates gegenüber unbehandeltem Calmodulin. Diese rein empirisch gewonnene Erkenntnis war ein wichtiger Schritt, um den Anteil des ubiquitinierten Calmodulins entscheidend zu erhöhen und machte somit erst die Aminosäurenanalyse des Konjugates möglich.

Die folgenden weiteren Untersuchungen der Ubiquitinierung des Calmodulins gestatten auch Aussagen über das Enzymsystem der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität im Reticulocytenlysat. Es sollen deshalb im weiteren Verlauf der Diskussion beide Aspekte berücksichtigt werden.

Wie die Kinetik der Konjugatbildung zeigt (Abb. 17), erfolgt die Akkumulation der Konjugate zeitabhängig, wie es für eine enzymatisch katalysierte Reaktion erwartet wird. Eine annähernde lineare Zunahme der Konjugatmenge erfolgt in den ersten 40-60 min (Abb. 17 Insert), während sich nach 90 min die Konjugatmenge nicht mehr wesentlich erhöht. Nach ca. 30 min ist die Hälfte der Konjugatmenge des 120 Minuten-Wertes gebildet.

In der Literatur wurden kinetische Untersuchungen bisher nur für APF II (=über DEAE-Sephacel angereicherte Enzymfraktion) vorgenommen (Diechmanover et al., 1980a; Hough und Rechsteiner, 1986). Hierbei wurden halbmaximale Konjugatkonzentrationen bereits nach 1,5 min gemessen. Es ist anzunehmen, daß sich im Lysat und in APF II ein Fließgleichgewicht für die Konjugate einstellt. Dieses wird durch das Zusammenwirken des ubiquitinierenden Systems und der Konjugat-abbauenden Protease aufrechterhalten. Eine Inaktivierung des ubiquitinierenden Systems durch endogene Proteasen kann ausgeschlossen werden, da der erneute Zusatz der Enzymfraktion nach 60 min die Menge des Calmodulin-Konjugates 1. Ordnung nicht erhöhte (nicht gezeigt). Ebenso zeigten Gehrke und Jennissen (1987) und Tanaka et al. (1983), daß die ATP- und Ubiquitin-abhängige Proteolyse von BSA bis zu 120 bzw. 180 min linear ist, was bei der Kopplung von Substratubiquitinierung und -degradation eine Inaktivierung des ubiquitinierenden Systems ausschließt.

Die Erhöhung der Enzymkonzentration im Inkubationsansatz (Abb. 19) führte zu einer Abnahme der spezifischen

Aktivität des ubiquitinierenden Systems. Ciechanover et al. (1980a) stellten dies für die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität in APF II (=über DEAE-Sephacel angereicherte Enzymfraktion) ebenfalls fest. Sie benutzten hierbei die endogenen Proteine der Enzymfraktion als Substrate.

Aus diesem Grund scheidet eine kompetetive Hemmung der Ubiquitinierung des Calmodulins durch diese Proteine als Ursache der Erniedrigung der spezifischen Aktivität aus. Eine solche war nicht auszuschließen, da die Konzentration der endogenen Proteine gleichzeitig mit der Enzymkonzentration erhöht wurde, während die Calmodulinkonzentration konstant blieb.

Somit erscheint eine Verdünnungsaktivierung des ubiquitinierenden Systems als wahrscheinlich, obwohl im Gesamtsystem (Ubiquitinierung und anschließende Proteolyse) eine solche nicht festgestellt werden konnte (Ciechanover et al., 1981; Gehrke 1987), wobei beide Autoren allerdings die DEAE-Sephacel angereicherte Enzymfraktion benutzten.

Die ermittelte apparente Michaelis-Konstante des Cosubstrates Ubiquitin zur Aktivierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozyten (Abb. 18) lag um den Faktor 16 höher als die zur Aktivierung der ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease (Abb. 6), die über DEAE-Sephacel angereichert wurde.

Dies mag zum einen daran liegen, daß die Bestimmung der spez. Aktivitäten zu einem Zeitpunkt erfolgte (60 min), wo im Gegensatz zur Proteolyse von BSA (Gehrke und Jennissen, 1987) eine zeitliche Linearität (Abb. 17) nur annähernd gegeben war, zum anderen ist daran zu denken, daß mit der Ubiquitinierung des Calmodulins auch höchst wahrscheinlich dessen Degradation erfolgt und somit aus der bestimmten Konjugatkonzentration kein Rückschluß auf den Umsatz des Calmodulins möglich ist. Vielmehr ist die Konjugatkonzentration ein Maß für das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkei-

ten des ubiquitinierenden Systems und der Konjugat-abhängigen Protease.

Aus diesem Grunde wurde der Wert als apparenter K_m -Wert bezeichnet, dessen Bestimmung trotzdem eine Aussage über die biologische Aktivität des Ubiquitins zuläßt.

Die apparente Michaelis-Konstante für das Substratprotein Calmodulin (Abb. 20) beträgt $8 \mu\text{M}$. Der Terminus "apparent" wurde gewählt, da die eingesetzte Enzymfraktion nicht rein war und somit eine Überlagerung der Ubiquitinierung und der Proteolyse sehr wahrscheinlich ist und die Messung zu einem Zeitpunkt erfolgte, wo nur noch eine annähernde zeitliche Linearität gegeben ist (Abb. 17 Insert). Der ermittelte Wert stimmt trotzdem gut mit dem von Gregori et al. (1987) für Dictyostelium-Calmodulin ermittelten K_m -Wert von $7 \mu\text{M}$ überein. Diese Arbeitsgruppe bestimmte den K_m -Wert durch Messung der Hydrolyse von ATP, die ebenfalls nicht mit der reinen Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität durchgeführt werden konnte.

Trotz der Einschränkungen erlaubt der Versuch zwei wichtige Aussagen.

Die grobe Abschätzung des K_m -Werts läßt den Schluß zu, daß dieser im Bereich der Calmodulinkonzentrationen in der Zelle liegt. In der Skelettmuskulatur beträgt sie ca $9 \mu\text{M}$ (berechnet nach Kaiser, 1988), während sie z.B. im Gehirn und Uterus noch höher liegt (Klee und Vanaman, 1982).

Der K_m -Wert zur Aktivierung der Phosphorylase Kinase ($23\text{--}39 \text{ nM}$) liegt mindestens um den Faktor 100 unter dem zur Aktivierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität.

Die Feststellung, daß die Ubiquitinierung von Calmodulin bei einer Häminkonzentration von $0,2 \text{ mM}$ völlig zum Erliegen kommt (Abb. 21), steht in Gegensatz zu den Aussagen von Haas und Rose (1981). Jedoch machten bereits Ettlinger und Goldberg (1980) bei ihrer grundlegenden Untersuchung über

die Kontrolle der Proteolyse durch Hämin auf große Schwankungen ihrer Ergebnisse aufmerksam, die bis zu einer Unbeeinflussbarkeit der Proteindegradation durch Hämin reichten.

5.4. Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität

Die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität aus Reticulozytenlysat durch den DEAE-Sephacelschritt war 8-10-fach und konnte mit Hilfe des Ubiquitinierungstestes erstmals ermittelt werden.

Bisherige Aussagen bezüglich des Schrittes waren nur über die ATP- und Ubiquitin-abhängige Protease möglich, wobei Gehrke und Jennissen (1987) eine ca. 6-fache Anreicherung ermittelten. Die geringeren Anreicherungsfaktoren für die Protease in den vorliegenden Präparationen (Tab. 16) liegen im Bereich der Schwankungsbreite der Präparation. Auf eine unterschiedliche Anreicherung des ubiquitinierenden Systemes und der Konjugat-abhängigen Protease durch den DEAE-Sephacelschritt deuteten zwar schon frühere Ergebnisse hin (Gehrke und Jennissen 1987), jedoch konnte sie jetzt erstmals mit Hilfe des FP-Testes nachgewiesen werden.

Die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität mit Hilfe der Affinitätschromatographie ergab für die Substrate Calmodulin und ox. RNase unterschiedliche Reinigungsfaktoren. Dies könnte durch eine verschiedene Anreicherung von Enzymen des ubiquitinierenden Systems erklärt werden. In der Literatur sind mehrere substratspezifische Ubiquitinierungsmodi bekannt, wofür unterschiedliche Ubiquitin-Trägerproteine verantwortlich sind (Pickart und Rose, 1985a). Ein Vergleich der Anreicherungsfaktoren mit Literaturwerten ist schwierig, da sie nur für die Untereinheiten der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität E₁-E₃ angegeben werden (Ciechanover et al., 1982) und nicht für

das Gesamtsystem, jedoch ist der erzielte Anreicherungs-faktor im Vergleich zu sonst üblichen Affinitätsverfahren sehr gering.

Somit sind die bisherigen Ergebnisse lediglich als positives Signal zu werten, daß die gewählte Gelmatrix, das Aktivierungsverfahren und der Substitutionsgrad zur weiteren Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität geeignet sind, wobei eine Optimierung der Methode nach einer Kapazitätsbestimmung der Ubiquitin-Sepharose sicherlich noch möglich ist.

5.5. Mögliche Bedeutung der Ubiquitinierung des Säuger-Calmodulins

Gleichwohl das Studium der ATP -und Ubiquitin-abhängigen Protease bisher nur in Modellsystemen durchführbar ist, ist die ermittelte apparente Michaelis-Konstante für das Säuger-calmodulin zur Aktivierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität ein erster starker Hinweis darauf, daß die Ubiquitinierung des Calmodulins auch in vivo stattfinden kann.

Über die mögliche biologische Bedeutung der Ubiquitinierung des Calmodulins kann nur spekuliert werden.

So wird z.B. der Ubiquitinierung des Homingrezeptors von Lymphozyten (Siegelman et al., 1986) und der des Semihistons H2A (Goldknopf et al., 1975) eine andere Funktion, als die der Degradation zugeschrieben.

Eine solche Modulation der biologischen Funktion könnte auch der Ubiquitinierung des Calmodulins zugrundeliegen. Hierfür spricht die Ca^{2+} -abhängige Mobilitätsänderung des Konjugates in der SDS-Gelelektrophorese, die nur aufgrund einer Calcium-bedingten Konformationsänderung möglich ist. Damit besitzt das Konjugat noch eine wesentliche Voraussetzung, um ähnlich dem Calmodulin biologisch aktiv zu sein.

Hingegen könnte eine Degradation des Calmodulin-Konjugates die Nebenbande des Konjugates 1. Ordnung als ein Proteolyseprodukt der 29,5 kDa-Bande erklären und ebenfalls den hohen Turnover des Calmodulins in der Skelettmuskulatur (Petersen-von Gehr und Jennissen, 1982).

Unter dem Gesichtspunkt der Proteolyse ließe sich aus den Ergebnissen der Calcium-abhängigen Ubiquitinierung (Tab. 13), aus der Ubiquitinierung der verschiedenen Calmodulin-bindungszustände (Tab. 14) und aus der Bestimmung des apparenten K_m -Wertes (4.3.11.) folgendes Schema für die Konstanthaltung der zellulären Calmodulinkonzentration formulieren:

Die Ubiquitinierung des Calmodulins erfolgt nur in Gegenwart von Calcium. Unter dieser Bedingung konkurriert das ubiquitinierende System mit anderen Calmodulin bindenden Enzymen um das Protein. Der K_m -Wert des Calmodulins ist aber für unser Modellenzym (Phosphorylase Kinase) 200-350-fach niedriger als für das ubiquitinierende System. Zudem ist das Calcium-abhängig an die Phosphorylase Kinase gebundene Calmodulin (=peripher gebundenes Calmodulin) nicht ubiquitinierbar. Daraus folgt, daß dem ubiquitinierenden System nur das Calmodulin zur Verfügung steht, das nicht zur Aktivierung von Calmodulin-sensitiven Enzymen benötigt wird. Das heißt, es kann nur das "überschüssige" Calmodulin ubiquitiniert werden.

Die K_m -Werte für andere Calmodulin-aktivierbare Enzyme liegen ebenfalls wie bei dem Modellprotein im nanomolaren Bereich (z.B. Adenylatcyclase, Brodstrom et al., 1975; Myosin Leichtketten Kinase, Klee und Vanaman, 1982).

Damit würde sich die Regulation des Calmodulinpools wesentlich vereinfachen, da die Synthese und die Proteolyse des Calmodulins unabhängig voneinander verlaufen könnten, denn dem proteolytischen System steht nur das "überschüssige"

Calmodulin zur Verfügung.

Die für dieses System nötige Veränderung in der Calciumkonzentration ist zum Beispiel in der Muskulatur gegeben.

Im Hinblick auf die wissenschaftliche Diskussion zeigt die Ubiquitinierung des Calmodulins, daß die These von Hershko et al. (1984), wonach gute Substratproteine über eine freie Alpha-NH₂-Gruppe verfügen müssen, nicht ohne weiteres verallgemeinert werden kann, denn Calmodulin ist N-terminal acetyliert und ist im Vergleich zu ox. RNase und Lysozym ein gutes Substrat für die Ubiquitin-konjugierende-Aktivität (Abb. 16).

Hinsichtlich der Trimethyllysin-Hypothese (siehe 2.4) von Gregori et al. (1985) ergeben sich ebenfalls Hinweise, die an dieser Hypothese zweifeln lassen.

Im Isolat des Calmodulin-Konjugats ließ sich Trimethyllysin nachweisen (Tab. 10).

Säugercalmodulin ist reproduzierbar zu ubiquitinieren. Der Anteil des ubiquitinierten Calmodulins (0,5-1 %) ist hierbei genauso groß wie bei Dictyostelium-Calmodulin (0,5 %; Gregori et al., 1987). Eine Demethylierung des Trimethyllysins im Inkubationsansatz ist unwahrscheinlich, da kein Unterschied in der Enzympräparation besteht und somit von Gregori et al. hätte auch festgestellt werden müssen.

Der Nachweis von Konjugaten 2. und 3. Ordnung ist ein starker Hinweis, daß mindestens 3 Lysine des Calmodulins ubiquitinierbar sind und nicht nur das Lysin 115. Damit entfällt die Schutzwirkung durch die Methylierung des Lysins 115. Das Vorliegen von Polyubiquitinketten in den Konjugaten 2. und 3. Ordnung ist ebenfalls unwahrscheinlich, da bei den bisher überprüften Substraten eine solche Kettenbildung erst für Konjugate ab der 6. Ordnung von Bedeutung war (Hershko und Heller, 1985).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Ubiquitinierung des Calcium-abhängigen Enzymaktivators Calmodulin untersucht.

Als eine Voraussetzung hierzu war die Isolierung von Ubiquitin nötig. Durch Modifikation einer bereits bestehenden Methode konnte die Ubiquitinausbeute erhöht werden.

Es gelang erstmals der Nachweis einer Polyubiquitinierung des Säugercalmodulins (trimethyliert).

Die Charakterisierung der Ubiquitin-Calmodulin-Konjugate zeigte, daß diese noch zu einem Calcium-induzierten Konformationswechsel fähig sind und damit noch die wesentliche Voraussetzung besitzen, um ähnlich dem unkonjugierten Protein biologisch aktiv zu sein.

Im isolierten Konjugat konnte Trimethyllysin nachgewiesen werden. Für den Nachweis war die Entwicklung einer Methode zur Isolierung der Calmodulin-Konjugate 1. Ordnung notwendig.

Zur Quantifizierung der Ubiquitinierung des Calmodulins wurde ein neuer Test (FP-Test) entwickelt, der gleichermaßen eine Charakterisierung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität erlaubt.

Es konnte nachgewiesen werden, daß nur die Calcium-haltige Form des Proteins ubiquitinierbar ist. Die Ubiquitinierung des Calmodulins erfolgt somit konformationsabhängig. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Calmodulinubiquitinierung bewirkt eine Konkurrenz der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität mit Calmodulin-aktivierbaren Enzymen, die dieses Protein ebenfalls Ca^{2+} -abhängig binden.

Es gelang weiter nachzuweisen, daß die Ca^{2+} -abhängige Affinität des Calmodulins zur Ubiquitin-konjugierenden-

Aktivität ($K_m = 8 \mu M$) mindestens um den Faktor 100 niedriger liegt als zur Phosphorylase Kinase ($K_m = 23-39 nM$). Von großer Bedeutung hierbei ist, daß das Calcium-abhängig an dieses Enzym gebundene Calmodulin (=peripher gebundenes Calmodulin) nicht ubiquitiniert werden kann. Ebenso ist die integral gebundene Delta-Untereinheit der Phosphorylase Kinase, die mit Calmodulin identisch ist (=integral gebundenes Calmodulin) nicht ubiquitinierbar.

Zusätzlich konnte anhand der Ubiquitinierung des Calmodulins die Anreicherung der Ubiquitin-konjugierenden-Aktivität durch Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie bestimmt werden.

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß nur das Calmodulin, welches nicht zur Aktivierung Calmodulin-sensitiver Enzyme benötigt wird, ubiquitinierbar ist.

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON THE ENZYMATIC LINKAGE OF THE SIGNAL POLYPEPTIDE UBIQUITIN TO THE ENZYME ACTIVATOR CALMODULIN

The aim of this thesis was to investigate the ubiquitination of the calcium dependent enzyme activator calmodulin.

As a precondition ubiquitin had to be isolated. An already existing technique was modified and improved.

Polyubiquitination of mammalian calmodulin (trimethylized) could thus be established for the first time. Characterization of ubiquitin-calmodulin conjugates showed a calcium induced conformation change of these conjugates. For this reason they still meet the essential precondition for being biologically active like the unconjugated protein.

Within the isolated ^{125}J -conjugate trimethyllysin could be established. In order to achieve this result a new method for the isolation of calmodulin conjugates of the first order had to be developed.

A new test (FP-Test) to quantify the ubiquitination of calmodulin was devised. With this test it was possible to characterize the ubiquitin conjugating activity.

It could be established that only the calcium containing protein variety can be ubiquitinated. The ubiquitination of calmodulin depends on its conformation.

The fact that calmodulin ubiquitination is calcium dependent results in a competition of ubiquitin conjugating activity with calmodulin binding enzymes which are able to bind this protein in the presence of calcium.

Furthermore it could be shown that the calcium dependent affinity of calmodulin towards ubiquitin conjugating activity ($K_m = 8 \mu M$) is at least two orders of magnitude lower than the corresponding affinity of calmodulin towards phosphorylase kinase (=calmodulin binding enzyme; $K_m = 23-39 \text{ nM}$).

It is of prime importance that calmodulin bound in a calcium dependent manner to this enzyme (= peripherally bound calmodulin) cannot be ubiquitinated. Equally the integrally bound delta subunit of the phosphorylase kinase, known to be identical with calmodulin (= integrally bound calmodulin), cannot be affected by ubiquitination.

Furthermore the enrichment of ubiquitin conjugating activity by ion exchange chromatography and affinity chromatography could be measured.

It is concluded that only calmodulin which is not required by calmodulin binding proteins in the cell can be ubiquitinated.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Autric, F., Ferraz, C., Kilhoffer, M.C., Cavadore, J.C. und Demaille J.G. (1980): Large-scale purification and characterization of calmodulin from ram testis
Biochim. Biophys. Acta 631, 139-147
- Bazari, W.L. und Clarke, M. (1981): Characterization of a novel calmodulin from Dictyostelium discoideum
J. Biol. Chem. 256, 3598-3603
- Bjerrum, J., Schwarzenback, G. und Sillen, L.G (1957) in:
Stability Constants: Organic Ligands
The Chemical Society, London
- Böhm, H. und Jennissen, H.P. (1985): Inhibition of phosphorylase kinase by antibodies against the delta-subunit (Calmodulin)
J. Musc. Cell. Res. 6, 93-94
- Bolton, A.E und Hunter, W.M (1973): The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent
Biochem. J. 133, 529-539
- Botbol, V. und Scornik, O.A. (1979): Intermediates in the degradation of abnormal globin
J. Biol. Chem. 254, 11254-11257
- Brand, W.F. und von Holt, C. (1986): Amino-acid composition and gas phase sequence analysis of proteins and peptides from glass fiber and nitrocellulose membrane electro-blots
in Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis
161-178
Springer Verlag, Berlin Heidelberg

- Brostrom, C.O., Huang, Y. Breckenridge, B.M. und Wolff, D.J. (1975): Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 64-68
- Burgess, W.H. (1982): Characterization of calmodulin and calmodulin isotypes from sea urchin gametes
J. Biol. Chem. 257, 1800-1804
- Canfield, R.E. (1963): The amino acid sequence of egg white lysozyme
J. Biol. Chem. 238, 2698-2707
- Chafouleas, J.G., Dedman, J.R., Munjaal, R.P. und Means, A.R. (1979): Calmodulin
J. Biol. Chem. 254, 10262-10267
- Chandler, C.S. und Ballard, F.J. (1978): Accelerated breakdown of reticulocyte protein formed under conditions of amino acid depletion
Biochem. J. 176, 151-158
- Cheung W.Y. (1970): Cyclic 3',5' -nucleotide phosphodiesterase
Biochem. Biophys. Res. Com. 38, 533-538
- Cheung, W.Y. (1980): Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation
Science 207, 19-27

Cheung, W.Y. (1985): Biological functions of calmodulin
The Harvey Lecture Series 79, 173-216

Childers, S.R. und Siegel, F.L. (1975): Isolation and
purification of a calcium-binding protein from
electroplax of *Electrophorus electricus*
Biochim. Biophys. Acta 405, 99-108

Ciechanover, A., Hod, Y. und Hershko, A. (1978): A heat-
stable polypeptide component of an ATP-dependent
proteolytic system from reticulocytes
Biochem. Biophys. Res. Comm. 81, 1100-1105

Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A. und
Herschko, A. (1980a): ATP-dependent conjugation of
reticulocyte proteins with the polypeptide required
for protein degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1365-1368

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H., Ferber, S. und
Hershko, A. (1980b): Characterization of the heat-
stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic
system from reticulocytes
J. Biol. Chem. 255, 7525-7528

Ciechanover, A., Heller, H., Katz-Etzion, R. und Hershko,
A. (1981): Activation of the heat-stable polypeptide
of the ATP-dependent proteolytic system
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 761-765

Ciechanover, A., Elias, S., Heller, H. und Hershko, A.
(1982): "Covalent affinity" purification of ubiquitin-
activating enzyme
J. Biol. Chem. 257, 2537-2542

- Ciechanover, A., Finley, D. und Varshavsky, A (1984): The ubiquitin mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation
J. Cell. Biochem. 24, 27-53
- Ciechanover, A., Wolin, S., Steitz, J.A. und Lodish, H.F. (1985): Transfer RNA is an essential component of the ubiquitin- and ATP-dependent proteolytic system
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1341-1345
- Clark, M., Bazari, W.L. und Kayman, S.C. (1980): Isolation and properties of calmodulin from Dictyostelium discoideum
J. Bacteriol. 141, 397-400
- Cleland, W.W. (1967): The statistical analysis of enzyme kinetic data
Adv. Enzymology 29, 1-32
- Cohen, P. (1973): The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase and the molecular basis of its activation reactions
Eur. J. Biochem. 34, 1-14
- Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. und Nairn, A.C. (1978): Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of brain skeletal muscle phosphorylase kinase
FEBS Letters 92, 287-293
- Cohen, P. (1980): The role of calcium ions, calmodulin and troponin in the regulation of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle
Eur. J. Biochem. 111, 563-574

- Dayhoff, M.O. (1972): Atlas of protein sequence and structure
Nat. Biomed. Res. Found. 5, Washington USA
- Dedman, J.R., Potter, J.D., Jackson, R.L., Johnson, J.D.
und Means, A.R. (1977): Physiochemical properties of
rat testis Ca^{2+} -dependent regulator protein of
cyclic nucleotide phosphodiesterase
J. Biol. Chem. 252, 8415-8422
- DeMartino, G.N. und Goldberg, A.L. (1979): Identification
and partial purification of an ATP-stimulated
alkaline protease in rat liver
J. Biol. Chem. 254, 3712-3715
- Dreker, L., Schwarz, J., Reichel, W. und Hilschmann, N.
(1976): Die Primärstruktur eines monoklonalen IgG1-
Immunoglobulins (Myelomprotein Nie), I
Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 357, 1515-1540
- Etlinger, J.D. und Goldberg, A.L. (1977): A soluble ATP-
dependent proteolytic system responsible for the
degradation of abnormal proteins in reticulocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 54-58
- Etlinger, J.D. und Goldberg, A.L. (1980): Control of
protein degradation in reticulocytes and reticulocyte
extracts by hemin
J. Biol. Chem. 255, 4563-4568

- Ferber, S. und Ciechanover, A. (1986): Transfer RNA is required for conjugation of ubiquitin to selective substrates of the ubiquitin and ATP-dependent proteolytic system
J. Biol. Chem. 261, 3128-3134
- Gavilanes, J.G., Gonzalez de Buitrago, G., Perez-Castells, R. und Rodriguez, R. (1982): Isolation, characterization, and amino acid sequence of a ubiquitin-like protein from insect eggs
J. Biol. Chem. 257, 10267-10270
- Gehrke, P.P. und Jennissen, H.P. (1985): Selective homeostasis of proteins in striated muscle
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 366, 791
- Gehrke, P.P. (1987): Untersuchung zur ATP-abhängigen Proteolyse und zur Rolle des Ubiquitins in der Herzmuskulatur im Vergleich zur ATP- und Ubiquitin-abhängigen Protease in Reticulozyten
Diss. der Abteilung für Biologie an der Ruhr-Universität, Bochum
- Gehrke, P.P. und Jennissen, H.P. (1987): ATP-dependent proteolysis and the role of ubiquitin in rabbit cardiac muscle
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 691-708
- Gehrke, P.P., Ziegenhagen, R.G. und Jennissen, H.P. (1987): Isolation of ubiquitin conjugating activity from cardiac muscle by affinity chromatography on ubiquitin-agarose
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 744

- Goldknopf, I.L. und Busch, H. (1977): Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 864-868
- Grand, R.J.A., Shenolikar, S. und Cohen, P. (1981): The amino acid sequence of the delta-subunit (Calmodulin) of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase
Eur. J. Biochem. 113, 359-367
- Gregori, L., Marriott, D., West, C.M. und Chau, V. (1985): Specific recognition of calmodulin from Dictyostelium discoideum by the ATP ubiquitin-dependent degradative pathway
J. Biol. Chem. 260, 5232-5235
- Gregori, L., Marriott, D., Putkey, J.A., Means, A.R. und Chau, V. (1987): Bacterially synthesized vertebrate Calmodulin is a specific substrate for ubiquitination
J. Biol. Chem. 262, 2562-2567
- Haas, A.L. und Rose, I.A. (1981): Hemin inhibits ATP-dependent ubiquitin-dependent proteolysis: Role of hemin in regulating ubiquitin conjugate degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6845-6848
- Haas, A.L., Warms, J.V.B., Hershko, A. und Rose, I.A. (1982): Ubiquitin-activating enzyme
J. Biol. Chem. 257, 2543-2548
- Haas, A.L. und Rose, I.A. (1982): The mechanism of ubiquitin activating enzyme
J. Biol. Chem. 257, 10329-10337

- Haas, A.L. und Bright, P.M. (1985): The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates
J. Biol. Chem. 260, 12464-12473
- Hall, N. und Deluca, M. (1976): Electrophoretic separation and quantitation of creatine kinase isoenzymes
Anal. Biochem. 76, 561-567
- Heilmeyer, L. (1961): Lehrbuch der Inneren Medizin
Springer Verlag, Berlin S.381
- Hershko, A. und Tomkins, G.M. (1971): Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture
J. Biol. Chem. 246, 710-714
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. und Rose, I.A. (1980): Proposed role of ATP in protein breakdown: Conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis
Biochem. 77, 1783-1786
- Hershko, A., Ciechanover, A. und Rose, I.A. (1981): Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of the ATP-dependent protein breakdown
J. Biol. Chem. 256, 1525-1528
- Hershko, A., Eytan, E., Ciechanover, A. und Haas, A.L. (1982): Immunochemical analysis of the turnover of Ubiquitin-protein conjugates in intact cells
J. Biol. Chem. 257, 13964-13970

- Hershko, A. (1983): Ubiquitin: Roles in protein modification and breakdown
Cell 34, 11-12
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. und Ciechanover, A. (1983): Components of ubiquitin-protein ligase system
J. Biol. Chem. 258, 8206-8214
- Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D. und Heller, H. (1984a): ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1619-1623
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G. und Rose, I.A. (1984b): Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7021-7025
- Hershko, A. und Heller H. (1985): Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates
Biochem. Biophys. Res. Comm. 128, 1079-1086
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E. und Reiss, Y (1986): The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system
J. Biol. Chem. 261, 11992-11999
- Hiers, C.H.W. (1955): The oxidation of ribonuclease with performic acid
J. Biol. Chem. 219, 611-621
- Hough, R., Pratt, G. und Rechsteiner, M. (1986): Ubiquitin-lysozyme conjugates
J. Biol. Chem. 261, 2400-2408

- Hough, R. und Rechsteiner, M. (1986): Ubiquitin-lysozyme conjugates: Purification and susceptibility to proteolysis
J. Biol. Chem. 261, 2391-2399
- Hough, R., Pratt, G. und Rechsteiner, M. (1987):
Purification of two high molecular weight proteases in rabbit reticulocyte lysate
J. Biol. Chem. 262, 8303-8313
- Hubbard, M., Bradley, M., Sullivan, P., Shepherd, M. und Forrester, I. (1982): Evidence for the occurrence of calmodulin in the yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*
FEBS LETTERS 137, 85-88
- Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1974): An automated assay for phosphorylase kinase
Analytical Biochem. 57, 118-126
- Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1975): General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes
Biochem. 14, 754-760
- Jennissen, H.P., Petersen-von Gehr, J.K.H. und Botzet, G. (1985): Activation and inhibition of phosphorylase kinase by monospecific antibodies against preparatively isolated alpha, beta and gamma subunits
Eur. J. Biochem. 147, 619-630
- Kaiser (1988): Differenzierung verschiedener gebundener und eines freien Calmodulin-Pools in der Skelettmuskelzelle
Diss. an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

- Kakiuchi, S. und Yamazaki, R. (1970): Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PaF) from brain
Biochem. Biophys. Res. Comm. 41, 1104-1110
- Klee, C.B. und Vanaman, T.C. (1982): Calmodulin
Adv. in Protein Chemistry 35, 213-321
- Klinisches Labor (1974)
E. Merck, Darmstadt 12. Auflage, 28-30
- Kohse, K.P. und Heilmeyer Jr, M.G. (1981): The effect of Mg^{2+} on the Ca^{2+} -binding properties and Ca^{2+} -induced tyrosine-fluorescence changes of calmodulin isolated from rabbit skeletal muscle
Eur. J. Biochem 117, 507-513
- Kowit, J.D. und Goldberg, A.L. (1977): Intermediate steps in the degradation of a specific abnormal protein in *Escherichia coli*
J. Biol. Chem. 252, 8350-8357
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature 227, 680-685
- Loir, M., Caraty, A., Lanneau, M., Menezo, Y., Muh, J.P. und Sautiere, P. (1984): Purification and characterization of ubiquitin from mammalian testis
FEBS LETTERS 169, 199-204
- Lowry, H. O., Roseborough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265-275

- Özkaynak, E., Finley, D. und Varshavsky, A. (1984): The yeast ubiquitin gene: head-to-tail repeats encoding a polyubiquitin precursor protein
Nature 312, 663-666
- Parag, H.A., Raboy, B. und Kulka, R.G. (1987): Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system
EMBO Journal 6, 55-61
- Perry, G., Friedman, R., Shaw, G. und Chau, V. (1987): Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3033-3036
- Petersen-von Gehr, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1982): Multisubunit protein turnover: Differential turnover of the subunits of phosphorylase kinase and abnormal behavior of the calmodulin subunit
Abstr. Commun. 12th Int. Congress of Biochemistry 15-21.8. 1982, S. 126
- Pickart, C.M und Rose, I.A. (1985a): Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins
J. Biol. Chem. 260, 1573-1581
- Pickart, C.M. und Rose, I.A. (1985b): Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides
J. Biol. Chem. 260, 7903-7910

- Rabinowitz, M. und Fischer, J.M. (1964): Characteristics of the inhibition of hemoglobin synthesis in rabbit reticulocytes by threo-alpha amino beta-chlorobutyric acid
Biochim. Biophys. Acta 91, 313-322
- Rechsteiner, M. (1987): Ubiquitin-mediated pathway for intracellular proteolysis
Ann. Rev. Cell Biol. 3, 1-30
- Riley, D.A., Bain, J.L.W., Ellis, S. und Haas, A.L. (1988): Quantitation and immunocytochemical localization of ubiquitin conjugates within rat red and white skeletal muscles
J. Histochemistry and Cytochemistry 36, 621-632
- Rochette-Egly, C., Boschetti, E., Basset, P. und Egly, J.M. (1982): Interactions between calmodulin and immobilized phenothiazines
J. Chromatogr. 241, 333-344
- Rochette-Egly, C. und Stussi-Garaud, C. (1984): Selective detection of calmodulin in polyacrylamide gels by double staining with Coomassie Blue and silver
Electrophoresis 5, 285-288
- Roth, M. (1971): Fluorescence reaction for amino acids
Analytical. Chem. 43, 880-882
- Scherz, H., Kloos, G. und Senser, F. (1986): Die Zusammensetzung der Lebensmittel
Nährwert-Tabellen 1986/87
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

- Schlesinger, D.H., Goldstein, G. und Niall, H.D. (1975):
The complete amino acid sequence of ubiquitin, an
adenylate cyclase stimulating polypeptide probably
universal in living cells
Biochemistry 14, 2214-2218
- Schulze, W., Bickhardt, K., Bollwahn, W., von Mickwitz, G.
und Plonait (1980): Klinik der Schweinekrankheiten
Verlag M.& H. Schaper, Hannover, S 395
- Shanklin, J., Jabben, M. und Viestra, R.D. (1987): Red
light-induced formation of ubiquitin-phytochrome
conjugates: Identification of possible intermediates
of phytochrome degradation
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 359-363
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. und Maizel, J.V. (1967):
Molecular weight estimation of polypeptide chains by
elektrophoresis in SDS-polyacrylamide gels
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820
- Shenolikar, S., Cohen, P.T.W., Nairn, A.C. und Perry, S.V.
(1979): The role of calmodulin in the structure and
regulation of phosphorylase kinase from rabbit
skeletal muscle
Eur. Biochem. J. 100, 329-337
- Siegelman, M., Bond, M.W., Gallatin, W.M., John, T.St.,
Smith, H.T., Fried, V.A. und Weissman, I.L. (1986):
Cell surface molecule associated with lymphocyte
homing is a ubiquitinated branched-chain
glycoprotein
Science 231, 823-829

- Simpson, M.V. (1953): The release of labeled amino acids from the proteins of rat liver slices
J. Biol. Chem. 201, 143-154
- Speiser, S. und Etlinger, J.D. (1982): Loss of ATP-dependent proteolysis with maturation of reticulocytes and erythrocytes
J. Biol. Chem. 257, 14122-14127
- Swanstrom, R. und Shank, P.R. (1978): X-Ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I
Analytical Biochem. 86, 184-192
- Tanaka, K., Waxman, L. und Goldberg, A.L. (1983): ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin
J. Cell Biology 96, 1580-1585
- Van Eldik L.J. und Watterson, D.M. (1981): Reproducible production of antiserum against vertebrate calmodulin and determination of the immunoreactive site
J. Biol. Chem. 256, 4205-4210
- Vierstra, R.D., Langan, S.M. und Haas, A.L. (1985): Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, *Avena sativa*
J. Biol. Chem. 260, 12015-12021

- Watabe, S. und Kimura, T. (1985): ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex
J. Biol. Chem. 260, 5511-5517
- Watterson, D.M. Sharief. F. und Vanaman, T.C. (1980): The complete amino acid sequence of the Ca^{2+} -dependent modulator protein (Calmodulin) of bovine brain
J. Biol. Chem. 255, 962-975
- Waxman, L., Fagan, J.M., Tanaka, K. und Goldberg, A.L. (1985): A soluble ATP-dependent system for protein degradation from murine erythroleukemia cells
J. Biol. Chem. 260, 11994-12000
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K. und Haas A.L. (1980): Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes
J. Biol. Chem. 255, 7529-7532
- Wilkinson, K.D. und Audhya, T.K. (1981): Stimulation of ATP-dependent proteolysis requires ubiquitin with the COOH-terminal sequence Arg-Gly-Gly
J. Biol. Chem. 256, 9235-9241
- Williams, J. G. und Gratzer, W. B. (1971): Limitations of the detergent-polyacrylamide gel elektrophoresis method for molecular weight determination of proteins
J. Chromatogr. 57, 121-125
- Williams, D.C, O'Riordan, C., Beattie R.E. und O'Neill, C (1984): Multiple forms of calmodulin on sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide-gel electrophoresis
Biochem. Soc. Trans. 12, 472-474

Wissler, J.H. (1980): Verfahren zur Gewinnung von
funktionell und morphologisch intakten und
lebensfähigen Leukozyten aus Blut
Offenlegungsschrift DE 3009126 a1 Deutsches
Patentamt, München

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. P. Jennissen angefertigt.

Meinem Lehrer danke ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, für sein ständiges Interesse, die immer gewährte Diskussion und die stete Bereitschaft mit Rat und Tat zu helfen, ebenso für den Ansporn, den er gab.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Herrn Dr. P. Gehrke und Herrn Dr. J. Kaiser danke ich besonders für die guten Ratschläge und die Einweisungen in zahlreiche Arbeitsmethoden.

Frau Gundula Botzet danke ich herzlich für die Präparation des Calmodulins und der Phosphorylase Kinase sowie für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Labors für ihre Hilfsbereitschaft und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Danksagen möchte ich weiterhin Herrn Dr. Goldberg für die Durchführung der Aminosäurenanalyse.

LEBENS LAUF:

Name	Rainer Ziegenhagen
Geburtsdatum	22.3.57
Geburtsort	Buchen/Odenwald
Eltern	Georg und Gertrud Ziegenhagen, geb. Reimer
Ostern 1964	Einschulung in die Grundschule Osterburken
07.09.67	Eintritt in die Ganztageschule Osterburken
14.05.76	Abitur
01.07.76- 30.09.77	Grundwehrdienst
01.10.77	Berufsausbildung als Schreiner
16.07.79	Facharbeiterprüfung
17.07.79- 05.09.80	Tätigkeit als Facharbeiter
01.11.80	Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
16.01.86	Staatsexamen
24.02.86	Approbation als Tierarzt
seit April 86	Anfertigung der vorliegenden Dissertation
seit August 86	Teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungs- physiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

